

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal I
(Sanidad Animal)



ESTUDIO DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN
CEPAS DEL GÉNERO ARTHRINIUM: ACTIVIDAD
ANTIBIÓTICA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María de los Ángeles Calvo Torras

Bajo la dirección del doctor

Guillermo Suárez Fernández

Madrid, 2002

T 582.28
CAL
est

BIBLIOTECA UCM



5305314051

ESTUDIO DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN CEPAS DEL GENERO ARTHRIINIUM:

ACTIVIDAD ANTIBIOTICA

M^a de los ANGELES CALVO TORRAS

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL I. FACULTAD DE VETERINARIA.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DIRECTOR: Dr. D. GUILLERMO SUAREZ FERNANDEZ



R.- 20.341

MADRID

1993

ESTUDIO DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN CEPAS DEL GENERO ARTHRIINIUM:

ACTIVIDAD ANTIBIOTICA

M^a de los ANGELES CALVO TORRAS



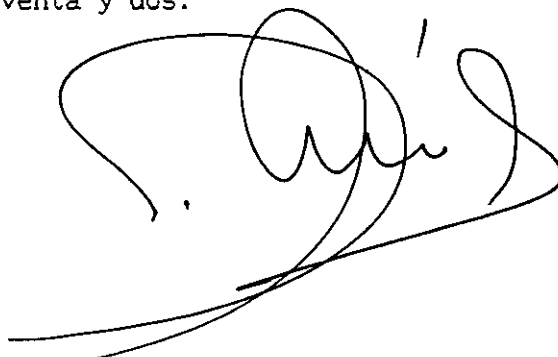
Memoria para optar al grado de Doctor en Veterinaria

Dr. D. GUILLERMO SUAREZ FERNANDEZ, CATEDRATICO DE UNIVERSIDAD
ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL I (SANIDAD ANIMAL)
DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID,

C E R T I F I C A:

Que la Tesis Doctoral que lleva por titulo "Estudio del metabolismo secundario en cepas del género Arthrinium: Actividad antibiótica", de la que es autora Dña. M^a de los ANGELES CALVO TORRAS, se ha realizado en los laboratorios de Microbiología de este Departamento bajo mi dirección, destacando su elevada densidad experimentas y la contribución positiva del planteamiento propuesto, tal y como se refleja en las conclusiones alcanzadas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a once de diciembre de mil novecientos noventa y dos.

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Dr. D. Guillermo Suarez Fernandez, is positioned below the text of the certificate. The signature is fluid and cursive, with a prominent loop at the top and a long, sweeping underline.

La realización de esta Tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión y financiación del Proyecto de investigación de referencia FAR88-0476, por la Comisión de Investigación Científica y Técnica.

Al finalizar un trabajo siempre surge la necesidad de reflexionar y evaluar la labor realizada y sin duda uno de los primeros sentimientos que afloran es el agradecimiento. No quisiera caer en tópicos, pero no hay muchas maneras de expresar la sincera gratitud que siento hacia todas y cada una de las personas que han hecho posible la elaboración y finalización de esta Tesis doctoral.

Deseo agradecer al Prof. Dr. D. Guillermo Suárez Fernández su constante apoyo y estímulo que han hecho realidad la consecución de los proyectos que al iniciar mi carrera universitaria me había propuesto. Tengo el honor de que haya sido mi director de Tesis por partida doble, cuando llevé a cabo la memoria para alcanzar el grado de Doctor en Farmacia obtenido en el año 1978 y actualmente al elaborar la correspondiente al Doctorado en Veterinaria.

Asimismo deseo hacer constar mi gratitud al Dr. D. Lucas Domínguez, Director del Departamento de Patología Animal I, por haberme facilitado todos los trámites para agilizar el aspecto burocrático de la presentación y defensa de la Tesis doctoral y mucho más importante, por haberme animado a la realización y finalización de la misma, hecho en el que han colaborado los ánimos infundidos por los restantes compañeros del Departamento.

Quisiera mencionar la ayuda incondicional que recibo, tanto en las tareas de docencia como de investigación por parte de mi amiga y colaboradora la Dra. Montserrat Agut Bonfills, sin ella la finalización de esta Tesis doctoral se hubiese hecho esperar.

Asimismo, deseo agradecer al Prof. Dr. D. Jorge Larrondo Véliz y al personal del Departamento de Química de la Universidad de Chile la realización e interpretación de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear y de Infrarrojos, así como sus comentarios acerca de la probable composición química de los metabolitos y sus valiosísimos consejos y comentarios en todo momento y a lo largo de la elaboración de la Tesis doctoral.

Sin duda, mi familia, es responsable directa de todo cuanto haya podido llevar a cabo a lo largo de mi vida, sin su constante cariño, apoyo, ayuda y comprensión, nada de cuanto, poco o mucho haya conseguido, hubiera podido ser realidad.

¡¡Muchas gracias!!

I N D I C E

1. I N T R O D U C C I O N	1
1.1. CONCEPTO DE METABOLISMO SECUNDARIO	1
1.2. DESCRIPCION DEL GENERO <u>ARTHRINIUM</u>	12
1.3. EL ESTADO TELEOMORFICO	20
1.4. METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GENERO <u>ARTHRINIUM</u>	22
 2. O B J E T I V O S Y P L A N D E T R A B A J O	 26
 3. M A T E R I A L Y M E T O D O S	 28
3.1. ELECCION DE MICROORGANISMOS	28
3.2. METODOS	31
3.2.1. Métodos para detectar la actividad inhibidora de los extractos de las cepas	31
3.2.1.1. Obtención de los extractos crudos y determinación del periodo óptimo de producción de metabolitos activos	31
3.2.1.2. Relación entre la curva de crecimiento de las cepas del género <u>Arthriniun</u> y la producción y acumulación de sustancias antimicrobianas	34
3.2.1.3. Purificación de los metabolitos secundarios con capacidad antimicrobiana constituyentes del ex- tracto crudo	35
3.2.1.4. Método pra realizar bioautografías	37
3.2.1.5. Métodos para determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto crudo total y de los componentes activos sobre bacterias y levaduras .	37

3.2.1.6. Método para detectar la actividad inhibidora de los metabolitos obtenidos sobre la germinación de hongos filamentosos	38
3.2.1.7. Método para detectar la actividad de los metabolitos sobre larvas de <u>Artemia salina</u>	39
3.2.1.8. Método para detectar al microscopio electrónico de barrido las variaciones morfológicas producidas por el extracto crudo de las cepas del género <u>Arthrinium</u> en estudio	40
3.2.1.9. Espectros de resonancia magnética nuclear e infrarrojos	41
3.2.1.10. Métodos para observar la acción de agentes mutagénicos sobre la producción de metabolitos secundarios activos en cepas del género <u>Arthrinium</u>	42
3.2.1.11. Determinación de la posible presencia de partículas semejantes a virus en cepas de <u>Arthrinium</u> y su relación con la capacidad inhibidora de las cepas en estudio	44
3.2.2. Optimización de la producción de metabolitos activos a través de procesos en fermentador de bajo volumen .	53
3.3. MEDIOS DE CULTIVO	56
4. RESULTADOS	58
4.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS	58
4.1.1. Resultados obtenidos en la detección de la actividad inhibidora del extracto crudo frente a bacterias y levaduras	58
4.1.2. Resultados obtenidos en la determinación del volumen mínimo de extracto crudo que inhibe el crecimiento de bacterias y levaduras	61

4.1.3. Resultados correspondientes a la detección de la actividad inhibidora de los extractos crudos sobre la germinación de los hongos filamentosos	64
4.1.4. Resultados obtenidos en la detección de la actividad letal de los extractos frente a larvas de <u>Artemia salina</u>	82
4.1.5. Resultados obtenidos en el estudio bajo microscopio electrónico de barrido	87
4.1.6. Resultados obtenidos para la detección del punto óptimo de producción de sustancias antibióticas en relación con el crecimiento del microorganismos en estudio	90
4.1.7. Resultados obtenidos tras la realización de las cromatografías en capa fina de los extractos crudos totales obtenidos de cultivos de 7, 14 y 21 días de las cepas del género <u>Arthrinium</u>	106
4.1.8. Resultados obtenidos tras la realización de las bioautografías	121
4.1.9. Resultados correspondientes a la acción de agentes mutágenos sobre la capacidad inhibidora de cepas del género <u>Arthrinium</u>	127
4.1.10. Resultados correspondientes a la detección de partículas semejantes a virus y su relación con los cambios morfológicos y de actividad de cepas del género <u>Arthrinium</u>	144
4.1.11. Resultados correspondientes a los espectros de IR y de RMN	154
4.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN FERMENTADOR	159

5. D I S C U S I O N	177
5.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS	177
5.1.1. Ensayos frente a bacterias y levaduras	177
5.1.2. Discusión de los resultados relativos al volumen mínimo de extracto crudo que inhibe el desarrollo de las bacterias y de la levadura ensayadas	183
5.1.3. Ensayos frente a hongos filamentosos	188
5.1.4. Discusión de los resultados obtenidos en la detección de la actividad letal de los extractos crudos sobre larvas de <u>Artemia salina</u>	192
5.1.5. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio bajo microscopio electrónico de las variaciones morfológicas producidas por extractos de cepas del género <u>Arthrrium</u>	195
5.1.6. Discusión de los resultados obtenidos para determinar el punto óptimo de producción de sustancias antibióticas y su relación con el crecimiento de los microorganismos en estudio	196
5.1.7. Discusión de los resultados correspondientes a las cromatografías en capa fina de los extractos crudos .	200
5.1.8. Discusión de los resultados obtenidos tras la realización de las bioautografías	204
5.1.9. Discusión de los resultados obtenidos por la acción de agentes mutágenos	205
5.1.10. Discusión de los resultados correspondientes a la detección de partículas semejantes a virus y su relación con los cambios morfológicos y de actividad de cepas del género <u>Arthrrium</u>	209
5.1.11. Discusión de los resultados correspondientes a los espectros y a la caracterización química de los metabolitos	210

5.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS REALIZADOS EN FERMENTADOR	211
5.3. DISCUSION DE LA POSIBLE UTILIZACION DE LOS METABOLITOS DEL GENERO <u>Arthrinium</u>	213
6. CONCLUSIONES	214
7. BIBLIOGRAFIA	218

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. CONCEPTO DE METABOLISMO SECUNDARIO

La definición exacta del concepto de metabolismo secundario es muy compleja. En términos generales se puede considerar que el metabolismo secundario incluye todos aquellos procesos por medio de los cuales los microorganismos producen sustancias que por su naturaleza química no pueden considerarse necesarias en su ciclo vital ni para el crecimiento celular.

La regulación del metabolismo secundario de los microorganismos incluye un control nutricional y un control de la tasa de crecimiento y se halla íntimamente relacionada con la regulación del metabolismo primario (Drew y Demain, 1977).

Una ilustración esquemática ideal de la relación entre el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios se presenta en la Fig. núm. 1.

En la primera fase, denominada trofofase, existe una marcada producción de biomasa sin que se detecte la presencia de metabolismo secundario.

Cuando el crecimiento declina o cesa totalmente, empieza la segunda fase o idiofase que se caracteriza por un ligero incremento de la biomasa y por la producción de metabolitos secundarios.

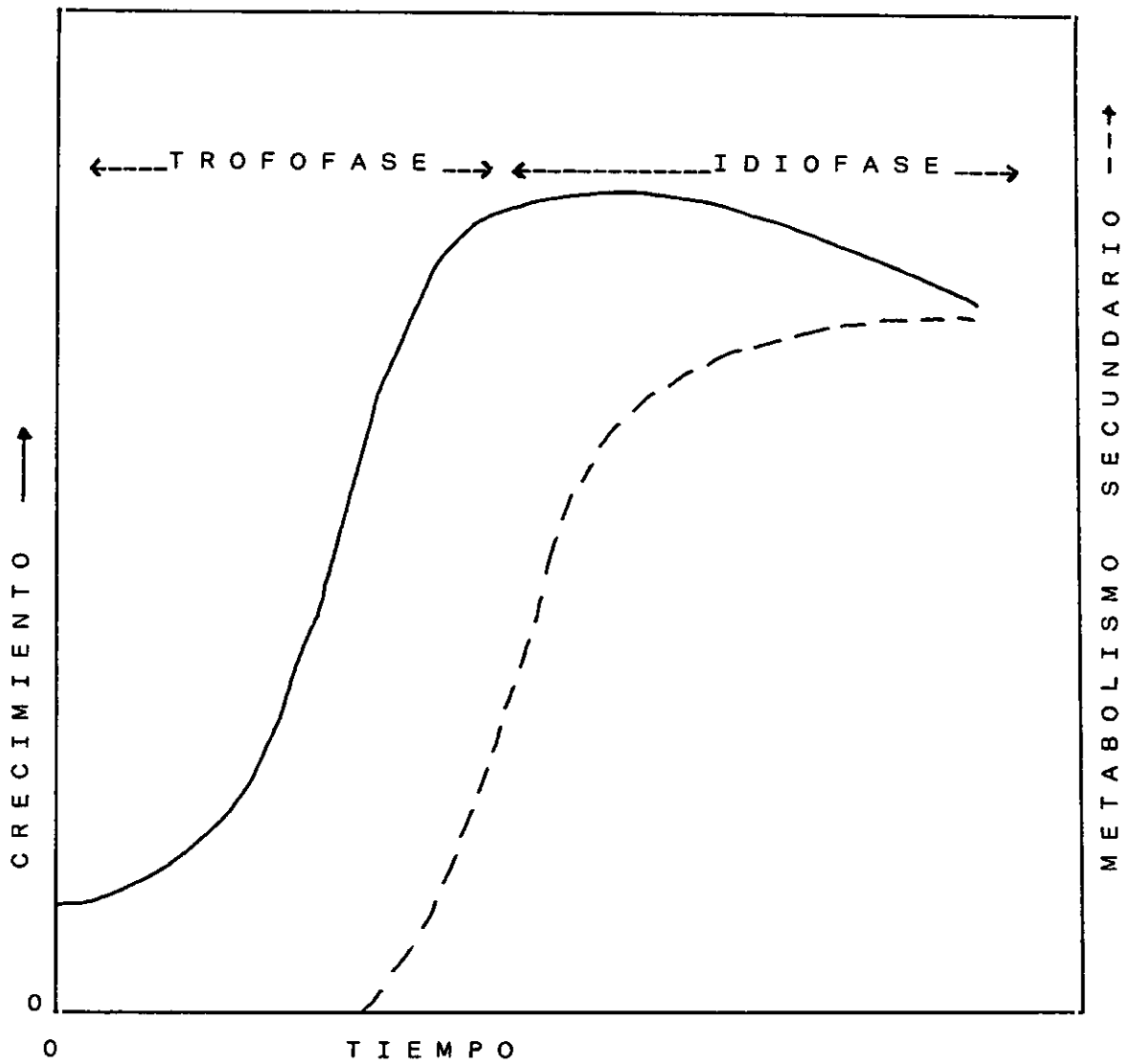


Fig. núm. 1.- Representación esquemática de la Trofofase e Idiofase, relacionando el crecimiento con la producción de metabolitos secundarios (Hirsch, 1981).

En la práctica cuando los microorganismos crecen en un medio de cultivo complejo la relación entre estas dos fases puede variar ligeramente, sin embargo, al desarrollarse en un medio mínimo se puede producir un solapamiento o completa asociación de las dos fases.

Los requerimientos nutritivos ejercen una notable influencia en la expresión del metabolismo secundario. En general, el metabolismo secundario se inicia cuando las condiciones nutricionales son limitantes y cesa el crecimiento. En diversos estudios se ha observado que en la regulación del metabolismo secundario están implicadas diversas fuentes de carbono, energía, fósforo y nitrógeno (Griffin, 1981).

Los mecanismos que regulan el metabolismo primario están implicados en la regulación del metabolismo secundario (Drew y Demain, 1977). Se ha observado, por ejemplo, que las enzimas específicas de las vías biosintéticas del metabolismo secundario están ausentes durante la trofofase. Otros estudios indican que estas enzimas están bajo la regulación de la represión catabólica que ha sido demostrada al ensayar el efecto de inhibidores del RNA y de la síntesis proteica sobre las enzimas de la síntesis del metabolismo secundario, mostrando que es necesaria una nueva síntesis proteica para la aparición de estas enzimas, pero no actúan porque están inactivadas (Griffin, 1977).

La naturaleza concreta de los mecanismos moleculares de la regulación nutricional en el metabolismo secundario es desconocida, sin embargo si se conoce la importancia que ejercen la represión catabólica y la inhibición del catabolismo sobre el mismo.

Los metabolitos secundarios son productos naturales (Drew y Demain, 1977). Algunos tienen capacidad antibiótica y pueden ser elaborados y acumulados por organismos vivos de complejidad y características diversas, entre los que destacan hongos miceliares, Actinomycetales, algunas algas, líquenes, otros vegetales e incluso algunos insectos (Demain y Piret, 1981).

El suelo y los productos agrícolas contienen también sustancias antibacterianas y antifúngicas y debemos

destacar la gran importancia que tienen actualmente en los problemas de salud pública la producción de micotoxinas por parte de hongos miceliares tanto en los vegetales en el campo como durante el almacenamiento de las cosechas o de piensos y alimentos destinados al consumo (Griffin, 1981).

Las micotoxinas se describen como metabolitos secundarios elaborados y acumulados por diversas especies fúngicas que se caracterizan por su potencial poder mutagénico y sus propiedades antibióticas (Garraway y Evans, 1984).

Un tema de discusión entre los diversos investigadores, se centra en descifrar, si la producción de antibióticos por parte de un microorganismo, le proporciona una ventaja de supervivencia frente a otras especies.

En la naturaleza existen muchos casos de competencia entre bacterias, hongos, protozoos, entre otros. Como ejemplo mencionaremos el caso de la formación de pigmentos por Serratia marcescens (prodigiosina) y Chromobacterium violaceum (violaceína), los cuales protegen a estas bacterias de ser ingeridas por protozoos (Demain y Piret 1981), en tanto que las cepas no pigmentadas, son fácilmente ingeridas.

Estas mismas observaciones se han podido deducir en varios microorganismos productores de metabolitos secundarios como el ácido penicílico, la piocianina o la citrinina, entre otros (Griffin, 1981).

Las investigaciones indicadas, sugieren que en el medio natural, el antagonismo entre los microorganismos está relacionado con la producción y acumulación de sustancias inhibidoras como consecuencia del metabolismo secundario de los microorganismos productores (Weinberg, 1981).

El estudio de las sustancias antagonistas elaboradas por los microorganismos en su metabolismo secundario fue iniciado por Pasteur en el año 1877.

Desde los estudios de Pasteur han sido numerosos los investigadores que han centrado su interés en el estudio del metabolismo secundario de los microorganismos, culminando estas investigaciones en el descubrimiento de los agentes antimicrobianos, algunos de los cuales han podido ser utilizados con fines terapéuticos, iniciándose con ello la era de los antibióticos.

La producción de metabolitos secundarios puede estar considerada como un tipo de diferenciación bioquímica que en muchos casos puede estar acompañada de diferenciación morfológica (Drew y Demain, 1977).

La mayoría de los metabolitos secundarios son de origen microbiano o de origen vegetal. Una minoría se han encontrado a partir de artrópodos o en animales marinos primitivos (Weinberg, 1981).

El 40% de los hongos filamentosos, actinomicetos y líquenes aislados de la naturaleza producen antibióticos (Demain & Piret, 1981).

El metabolismo secundario está muy extendido entre los microorganismos y emplea una maquinaria enzimática muy compleja, por lo que probablemente los productos resultantes de dicha acción deben tener un papel para la célula que los elabora y acumula (Froyshor, 1978).

Generalmente las especies productoras de estos metabolitos secundarios poseen un crecimiento lento o bien en ocasiones se manifiesta en aquellos cultivos cuyos individuos han dejado de dividirse, por lo que se sugiere que el metabolismo secundario puede desempeñar un papel en los procesos de diferenciación celular (Bu'Lock, 1975). También se ha descrito una actividad similar en el caso de determinadas hormonas durante el mismo proceso (Luckner et al., 1977).

Según los estudios de Haavik, publicados en el año 1979, las especies han desarrollado el metabolismo secundario como mejor respuesta a las peculiaridades y fluctuaciones del medio que las rodea o incluso para ser capaces de invadir nuevas localizaciones. El metabolismo secundario, en este contexto, podría ser considerado como una consecuencia de las variaciones ambientales, y por tanto como un mecanismo que incrementa las posibilidades de adaptación o de supervivencia en el medio que determina un cambio en las especies que lo producen.

Entre las diferentes funciones que han sido atribuidas a los antibióticos, se incluyen algunas que no son fácilmente demostrables, p. e. los metabolitos secundarios podrían ser productos sobrantes del metabolismo celular, materiales

de reserva alimenticios o bien productos resultantes de la degradación de macromoléculas (Demain, 1974).

Otras hipótesis que deben tenerse en cuenta son las siguientes:

a. - Hipótesis de la competencia (Demain, 1981)

La producción de antibióticos conllevaría la inhibición o muerte de especies competitivas del entorno del microorganismo productor. Esta sería una ventaja frente a la competencia de los individuos del entorno natural.

b. - Hipótesis del mantenimiento (Bu'Lock, 1961)

La función del metabolismo secundario es mantener la maquinaria bioquímica necesaria para la multiplicación celular cuando el crecimiento no es posible. No es el producto final del metabolismo secundario lo importante, sino que lo fundamental es que se de el metabolismo.

c. - Hipótesis del desequilibrio de crecimiento (Weinberg, 1971).

Los mecanismos de control de algunos microorganismos no serían lo suficientemente eficaces como para prevenir la sobresíntesis de determinados compuestos del metabolismo primario que no se producen cuando el crecimiento está equilibrado. Estos metabolitos primarios sobrantes o en exceso son transformados en metabolitos secundarios que son excretados por la célula productora. Esta transformación permite la supervivencia del microorganismo. Según esta hipótesis sería más importante el metabolismo secundario en sí, que el producto resultante de aquel.

d.- Hipótesis de la detoxificación
(Dhar & Khan, 1971)

Esta hipótesis propone que las moléculas acumuladas por el microorganismo y que le son tóxicas son transformadas en no tóxicas o menos tóxicas a través del metabolismo secundario.

e.- Hipótesis de la diferenciación
(Ito & Spezizen, 1972)

La diferenciación bioquímica de los microorganismos viene acompañada en multitud de ocasiones de diferenciación morfológica necesaria para la célula, p.e., el proceso de esporulación o de conidiación.

Los metabolitos secundarios son sintetizados mediante diferentes vías enzimáticas a partir de precursores que pueden ser intermediarios del metabolismo primario. Los diferentes procesos de la biosíntesis son llevados a cabo mediante enzimas que son específicos para cada metabolito secundario, aunque existen casos en que un enzima presenta una especificidad de sustrato más amplia por lo que puede actuar con una familia de compuestos concreta (Martin & Liras, 1989).

Los mecanismos enzimáticos que se utilizan en el metabolismo secundario son muy complejos. Un mismo enzima puede actuar en dos sentidos opuestos en dos especies diferentes.

El sistema de regulación del metabolismo secundario puede variar mucho. Suele existir una regulación de tipo nutricional de gran importancia. También puede existir control mediante moléculas endógenas: autorreguladoras. Estas moléculas pueden tener un papel importante en la diferenciación estructural, p.e. la producción de micelio aéreo de algunos Actinomicetales (Demain, 1986).

Otro proceso de regulación viene dado por el fosfato o por elementos traza que se hallan en el medio ambiente, p.e. la concentración de zinc es crítica para la producción de idiolitos en el caso de los hongos miceliarios y de los Actinomyces. Otros grupos de microorganismos poseen requerimientos nutricionales o limitaciones para otros elementos, entre los que destaca el cobre.

Existen sistemas en los que la presencia de un elemento traza estimula la producción de metabolitos secundarios, pero la concentración más elevada de otros inhibe la formación de aquellos. En estos casos el control suele llevarse a cabo mediante proteínas alostéricas (Weinberg, 1978). Los mutantes que son capaces de escapar de estas restricciones ambientales producirán una mayor concentración de metabolitos secundarios (Weinberg, 1981).

Los genes que contienen la información para la biosíntesis de antibióticos pueden ser cromosómicos o extracromosómicos. En hongos filamentosos y en plantas, los genes que codifican el metabolismo secundario suelen estar localizados en diferentes cromosomas.

Se ha planteado la hipótesis de que las enzimas necesarias para el metabolismo secundario en las células eucariotas se encuentran en orgánulos. Es decir que existe una compartimentización de los enzimas en diversos orgánulos (Martín y Liras, 1989).

La expresión de los genes que codifican la biosíntesis de los antibióticos no suele elevarse, por lo que se cree que durante la fase de alto crecimiento celular las síntesis de los antibióticos no son sintetizadas o bien que en caso contrario, se encuentran inhibidas.

Frecuentemente los metabolitos de las vías primarias suministran los precursores del metabolismo secundario. En la Fig. núm. 2 se resumen las vías metabólicas que interrelacionan el metabolismo primario y el secundario.

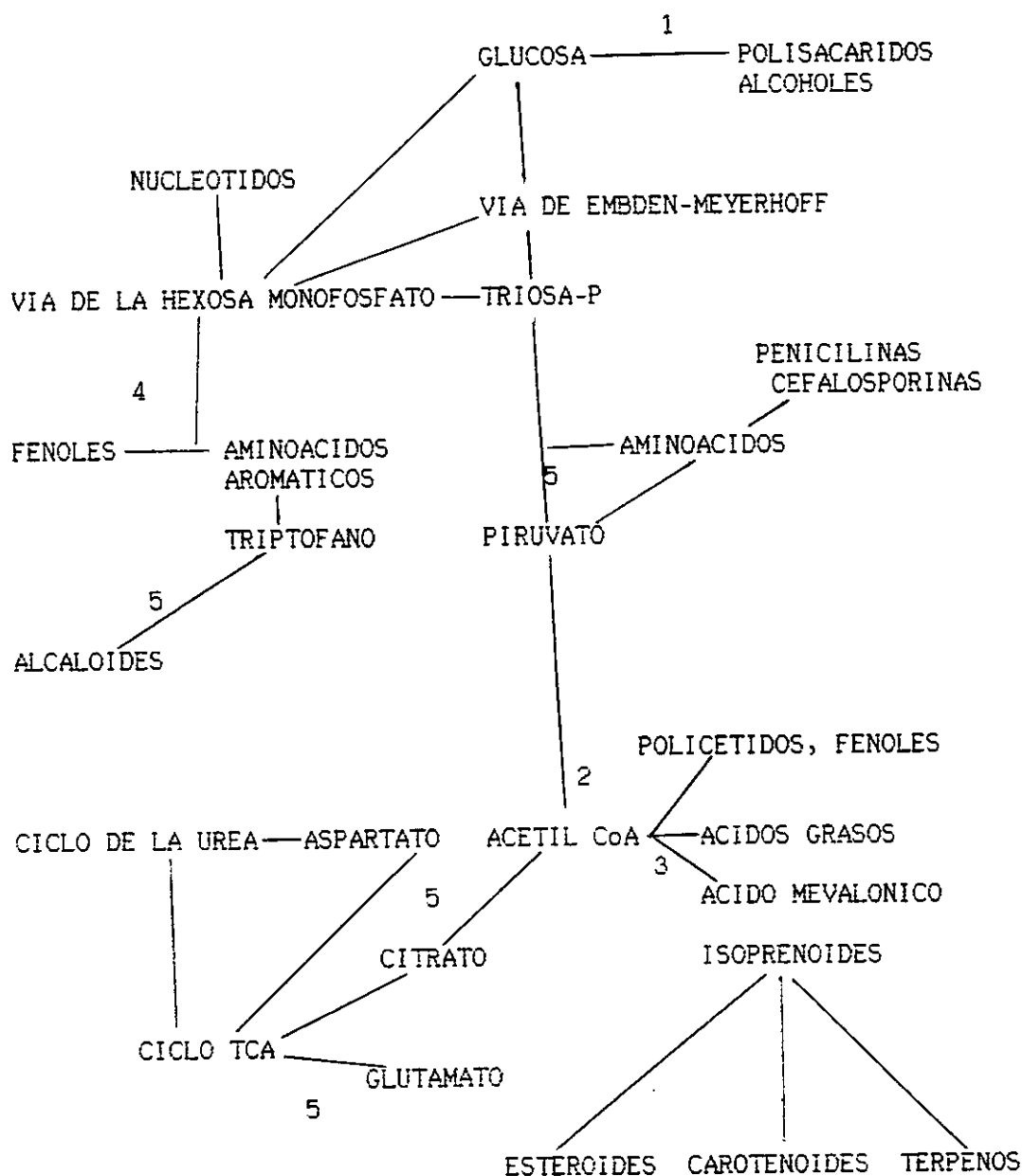


Fig. núm. 2.- Interrelaciones entre el metabolismo primario y el secundario. 1. Metabolitos derivados de la glucosa. 2. Ruta del malonato-acetato. 3. Ruta del ácido mevalónico. 4. Ruta del ácido shikímico y 5. Ruta de los derivados de aminoácidos (Griffin, 1981).

Las rutas a seguir para la biosíntesis de antibióticos suelen estar ramificadas. Al principio se ramifican para producir metabolitos primarios por una vía y secundarios por la otra. En algunos casos, el producto final resultante del metabolismo primario produce un efecto "feed-back" negativo, por lo que se inhibe tanto la síntesis de los metabolitos primarios como los secundarios.

En algunos casos actúan correpresores o inhibidores de las sintetetas de los antibióticos. Estos correpresores o inhibidores tienden a "desaparecer" para que la síntesis de antibióticos pueda tener lugar, p.e. mediante la regulación por nitrógeno, por fosfatos o por glucosa.

Otro sistema de regulación sería mediante un inductor o un activador que debería ser sintetizado por las células productoras de antibióticos o ser añadido al cultivo para iniciar la biosíntesis (Martin & Demain, 1980).

Una vez iniciada la síntesis de antibióticos, pueden existir tres posibles razones, por las que dicha síntesis se inhiba:

- 1.- Desaparición irreversible de una o de varias de las enzimas que intervienen en la síntesis del antibiótico.
- 2.- Por efecto de "feed-back" negativo por parte del antibiótico acumulado.
- 3.- Por carencia de precursores intermediarios del antibiótico.

En la naturaleza, el retraso en la producción del antibiótico hasta después de la trofofase es útil para el microorganismo productor, que suele ser sensible al antibiótico que el mismo produce mientras se halla en fase de crecimiento. Durante la idiofase el microorganismo productor desarrolla resistencias. Esto puede conseguirlo de varias formas: mediante modificaciones enzimáticas del antibiótico, alteraciones del

punto de actuación o modificando la cantidad de antibiótico excretado (Martin & Demain, 1980). Las resistencias que se desarrollan son fenotípicas.

Los microorganismos que producen un determinado antibiótico son más resistentes a la acción de dicho antibiótico que las especies incapaces de sintetizarlo. Este nivel de resistencia parece venir determinado genéticamente. En general, los mutantes con alto poder de producción, presentan un mayor nivel de resistencia al propio antibiótico (Waksman y Lechevalier, 1962).

Un mecanismo por el cual un microorganismo puede mantenerse resistente al antibiótico que el mismo ha sintetizado consiste en modificar la permeabilidad celular, p. e. el antibiótico es bombeado hacia el exterior celular contra gradiente de concentración. Durante la idiofase, una disminución en la permeabilidad celular puede proteger al microorganismo de las altas concentraciones extracelulares de su propio antibiótico.

También muchos microorganismos sintetizan enzimas los cuales son capaces de inactivar el antibiótico o bien de convertirlo en un derivado menos tóxico. A veces la inactivación puede darse por la acción de un metabolito producido por la propia célula (Cundliffe, 1989).

1.2. DESCRIPCION DEL GENERO Arthrinium

Una descripción del la género Arthrinium fue publicada por M. B. Ellis. Este micólogo recopiló todos los datos relativos al género Arthrinium y las especies aceptadas hasta el año 1976 en los dos tratados sobre Hyphomycetes dematiáceos que publicó en el año 1971 y 1976, respectivamente, bajo los títulos Dematiaceous Hyphomycetes y More Dematiaceous Hyphomycetes.

Las cepas que pueden ser incluídas en el género Arthrinium se caracterizan, según Ellis (1971, 1976), por los siguientes aspectos:

"Las colonias son compactas o dispersas, de color negro o marrón negruzco oscuro y frecuentemente poseen aspecto aterciopelado. Las fructificaciones son generalmente superficiales. El micelio es parcialmente superficial, parcialmente sumergido, en ocasiones las hifas forman conexiones entre ellas y pueden llegar a ser bastante estrechas para atravesar las cutículas del hospedador. No poseen estroma y carecen de setas e hifopodios. Los conidióforos son típicamente basáuxicos, macrone-matosos y mononematosos y se originan a partir de células madres aisladas, subesféricas, ampuliformes, con forma de tonel o de porra. Son simples, a menudo estrechas y ligeramente cilíndricas, generalmente incoloras excepto por la presencia de un septo transversal que puede ser altamente refringente y generalmente de color marrón. Las células conidiógenas son integradas, terminales e intercalares. Típicamente poliblasticas y denticuladas.

Los conidios o blastoconidios son solitarios, laterales o en ocasiones terminales. Poseen formas y tamaños

diferenciales según la especie y presentan un borde hialino característico o tubo germinal marronáceo. Generalmente son de paredes lisas y de color marrón (phaeoconidios). Carecen de septos. Algunas cepas presentan células estériles que se desarrollan en la zona de formación de los conidios y se caracterizan por ser de menor tamaño que los conidios y de forma distinta a ellos. Poseen en su interior uno o más cuerpos cúbicos refringentes típicos".

M.B. Ellis, en la primera de sus obras titulada, Dematiaceous Hyphomycetes, y posteriormente J. W. Chermichael y cols. en la obra Genera of Hyphomycetes, publicada en el año 1980, indican como sinónimos de Arthrinium a los siguientes géneros:

Camptoum Link, 1824

Goniosporium Link, 1824

Sporophleum Nees ex Link, 1824

Papularia Fries, 1825

Gonatosporium Corda, 1839

Microtypha Spegazzini, 1910

Tureenia Hall, 1915

Phaeoharziella Loubière, 1924

Innatospora van Beyma, 1929

Pseudobasidium Tengwall, 1942

Racemosporium Moreau & Moreau, 1941

?Rhinocephalum Kamyschko, 1961

Cole y Samson, en el año 1979, definen el desarrollo en los términos siguientes:

"El conidióforo doliiforme del anamorfo Arthrini-um de Apiospora montagnei Saccardo, produce un conidio holoblástico apical, que es inicialmente esférico, pero que se va transformando en lenticular. Al madurar el conidio, el cuello del conidióforo se estrecha ligeramente y se puede observar una ruptura circular de la pared externa del conidióforo que representa un estadio inicial del crecimiento basáuxico de la pared interna de la célula conidiógena. El desarrollo de las especies de Arthrini-um es característico de una ontogenia basáuxica. El primer conidio se desarrolla holoblásticamente en el ápice del conidióforo. El crecimiento de la capa interna de la pared, por debajo del septo basal del conidio terminal, inicia el desarrollo basáuxico de la célula conidiógena y causa la ruptura de la capa externa de la pared. La elongación de la célula conidiógena continua con la interposición de nueva pared, posiblemente desde el interior de la célula madre, justo por debajo del ápice de ruptura. Por encima de él y concomitantemente con la elongación de la hifa fértil, tiene lugar el desarrollo holoblástico de los conidios de forma sucesiva y alternativamente a uno y otro lado de la hifa fértil".

Hoy en día se acepta como correcta, aplicando los criterios del XIII Congreso Internacional de Botánica, celebrado en el año 1982 en Sidney, Australia la siguiente denominación para el género:

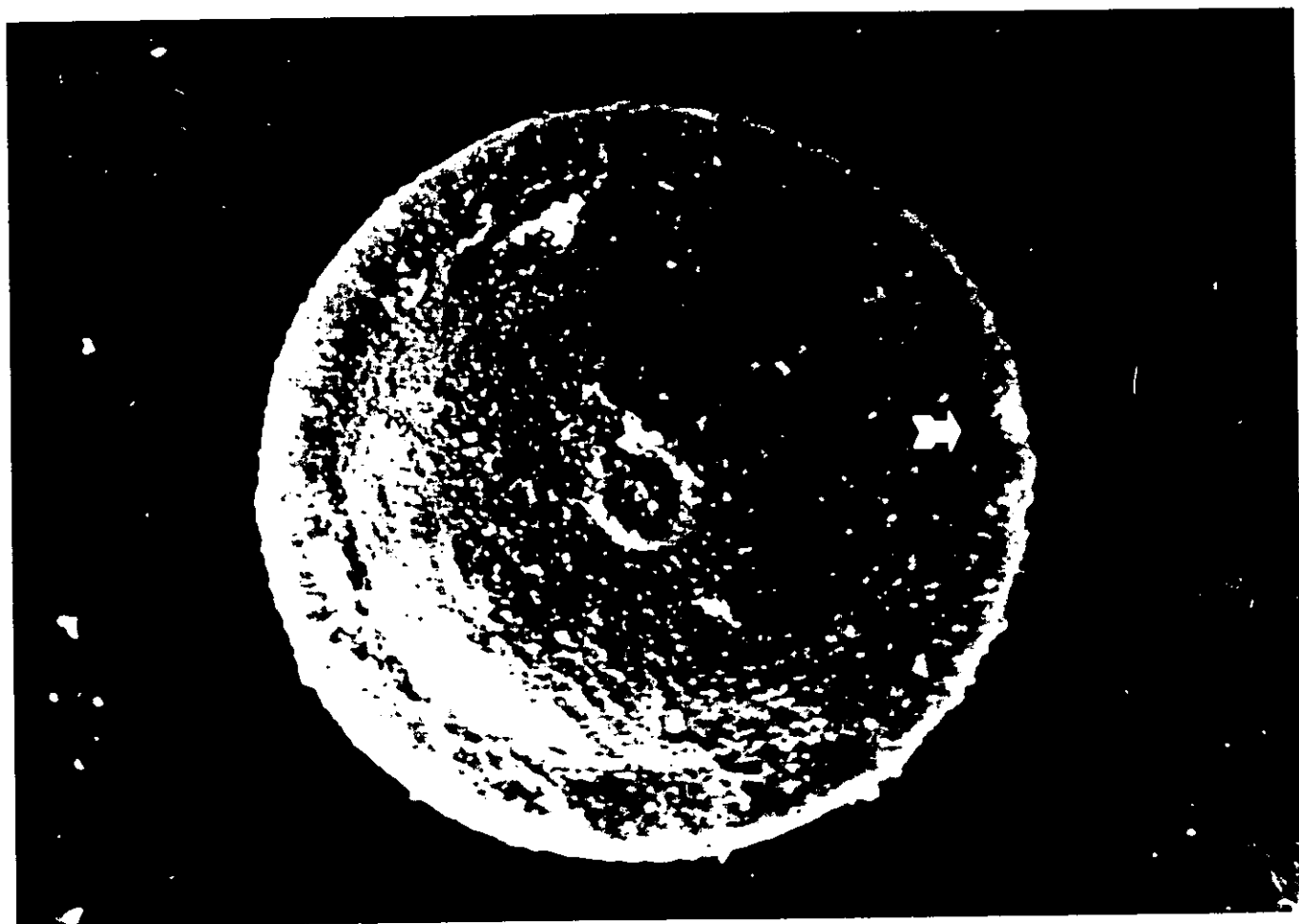
Arthrini-um Kunze ex Fries 1821

En el año 1992, Larrondo y cols. ampliaron en algunos aspectos la descripción de Ellis, aportando los siguientes datos:

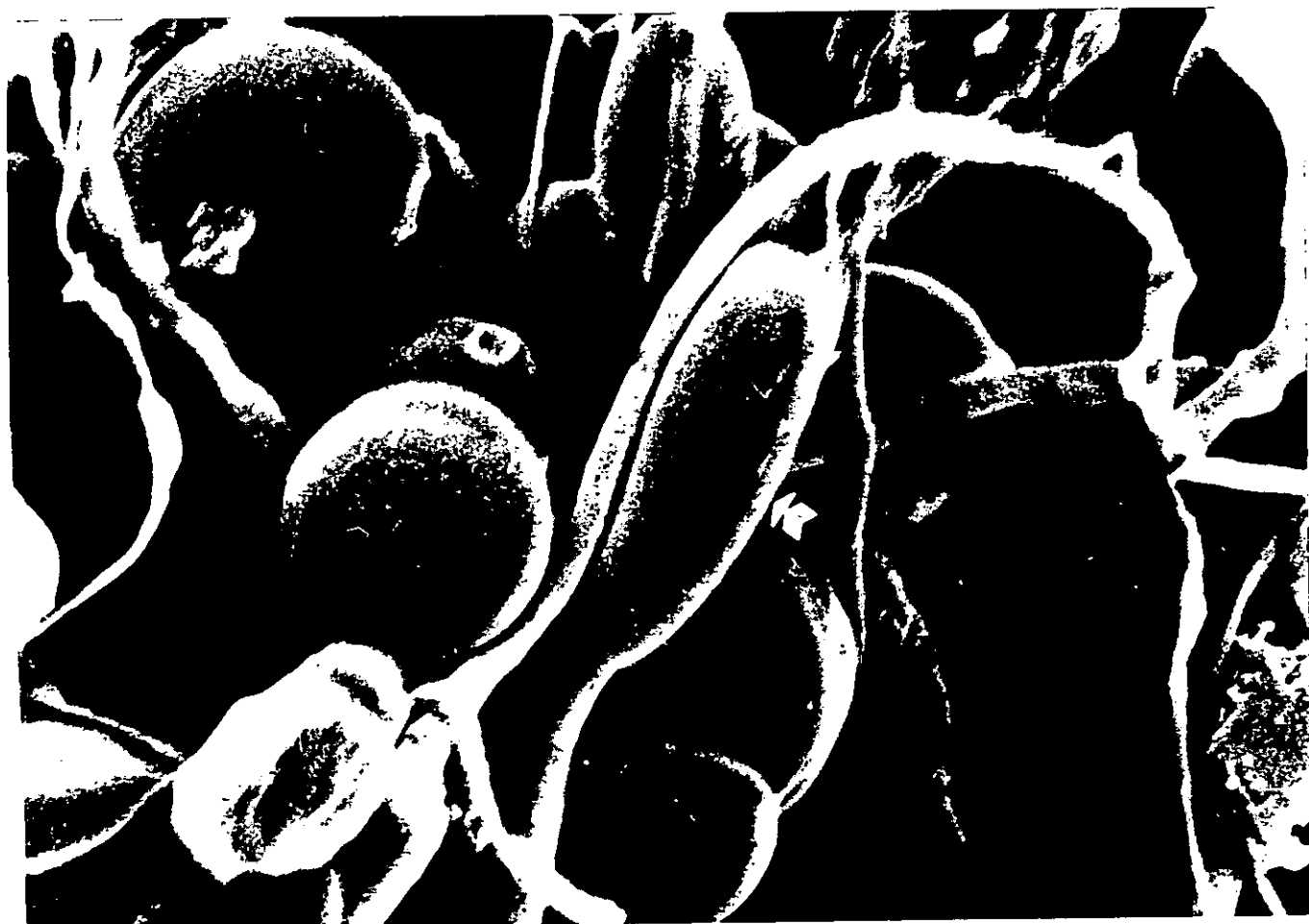
5305314051

"Las colonias del género Arthrinium se caracterizan por ser compactas o dispersas, cuando se desarrollan en agar extracto de malta al 2%, manteniéndolas por espacio de siete días a 28°C. Poseen coloración blanquecina que con el tiempo y a medida que maduran los conidios pasa a marronácea o a negruzca, aunque en algunas especies se mantiene blanquecina en una amplia zona de las colonias. Asimismo puede formar abundante micelio aéreo de color blanco o rosado, según la especie. El micelio rosado posee el pigmento intracelular, concentrado en zonas específicas de la hifa. Forma abundantes clamidosporas distribuidas por todo el micelio, generalmente en situación intercalar y solitarias, aunque pueden llegar a presentarse formando cadenas. Las clamidosporas son capaces de germinar dando lugar a la formación de nuevas colonias. Las colonias poseen en general un olor característico y abundante formación de gotas de exudado de color amarillento o rosado, transparentes que al evaporarse dejan huella. Asimismo pueden presentar pigmento difusible en el medio de cultivo, que es generalmente del mismo color que las gotas de exudado, amarillento o rosado según las especies. Los conidios son solitarios, laterales o en algunas especies terminales. No forman cadenas. Poseen formas y tamaños diversos diferenciales según las especies y poseen una zona que se observa como hialina bajo el microscopio óptico y de densidad variable bajo el microscopio electrónico de barrido. Los conidios son de color oscuro, marronáceo o marrón negruzco, carecen de septos y generalmente poseen las paredes lisas. Algunas cepas poseen células estériles que se desarrollan en el lugar de formación de los conidios y se caracterizan por ser de menor tamaño que los conidios y de forma diferente a ellos".

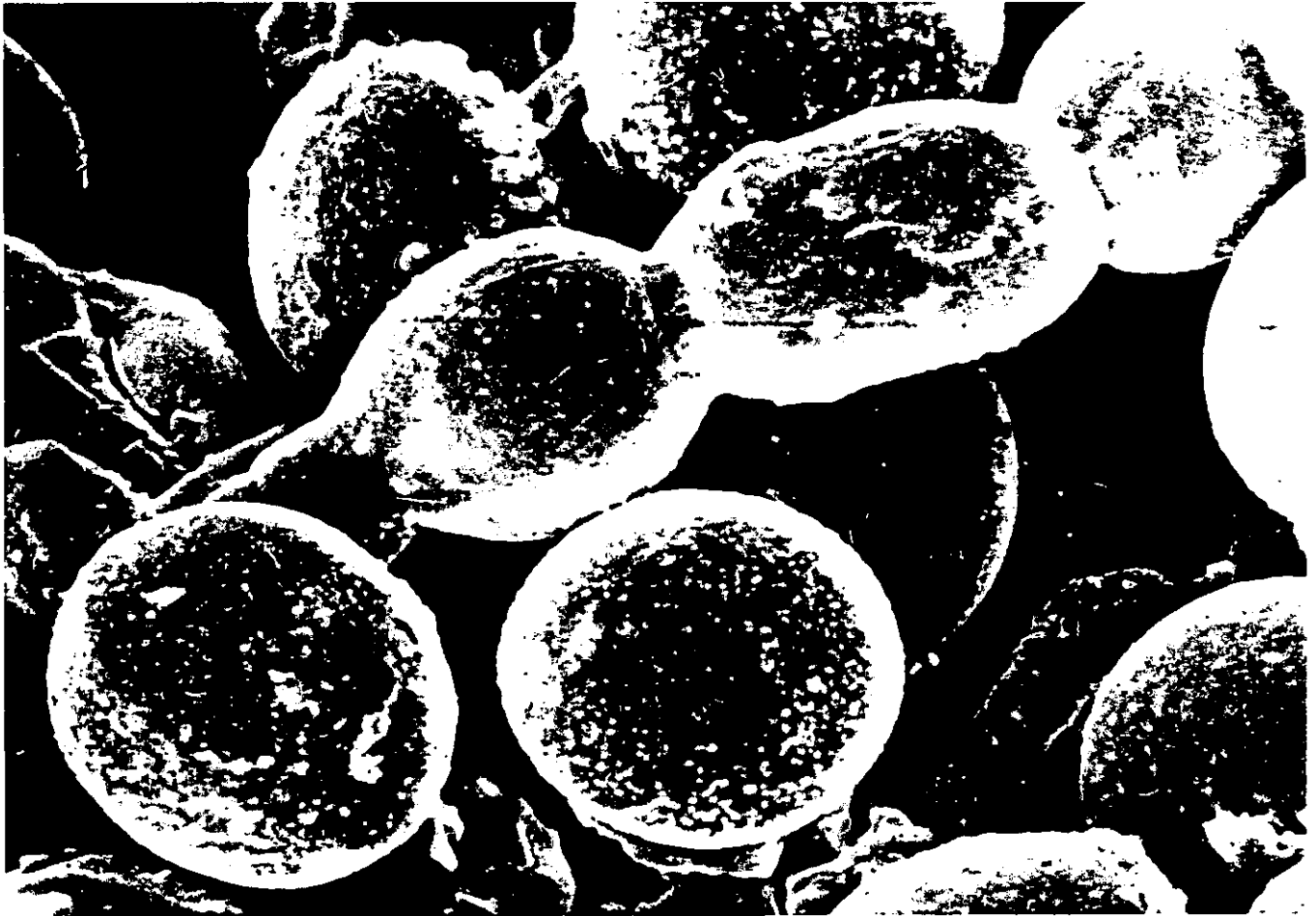
En las Fotografías siguientes pueden apreciarse las características diferenciales del género Arthrinium.



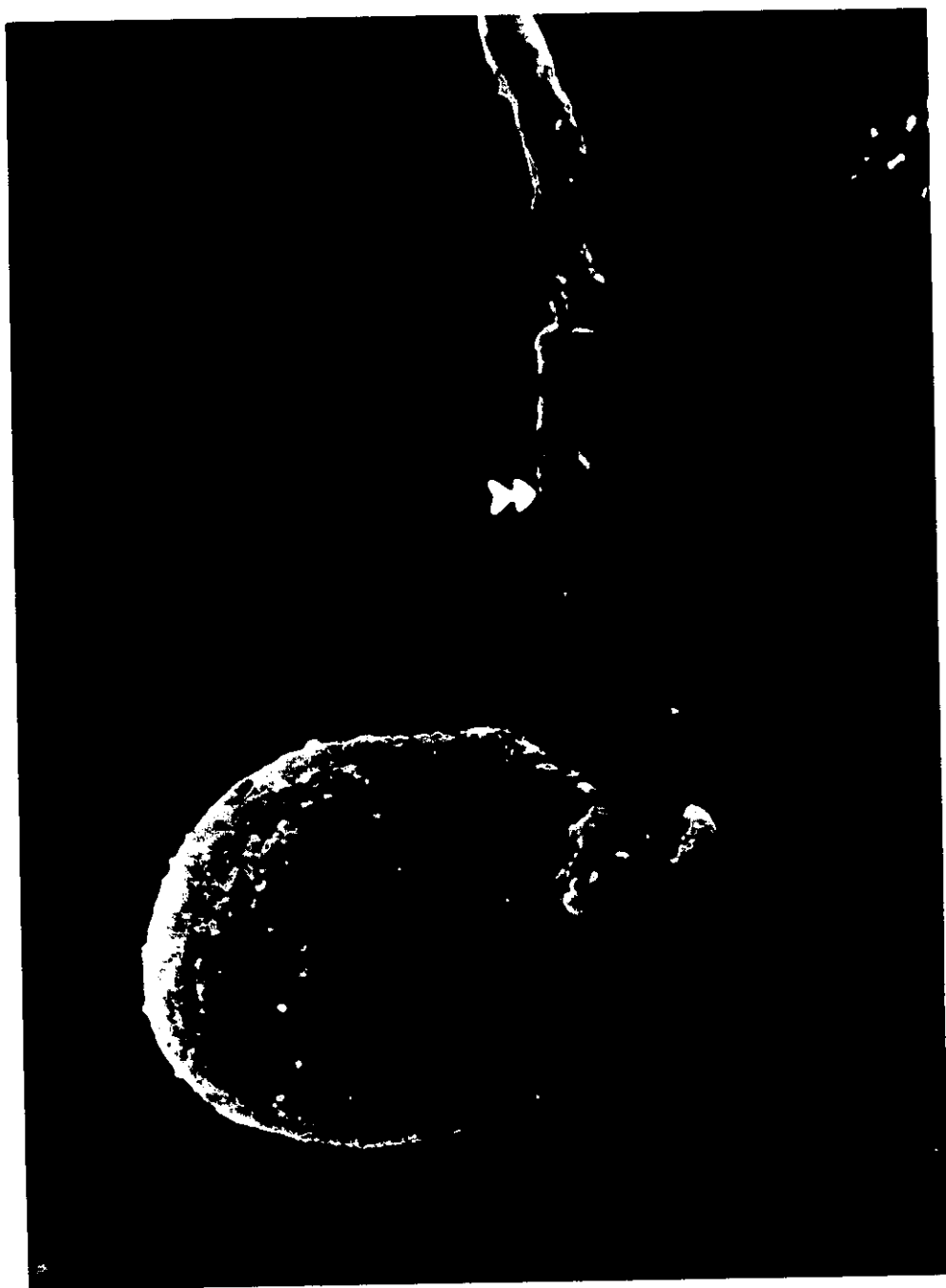
Fotografía núm. 1.- Conidio típico del género Arthrini.
La flecha indica la zona marginal
característica.



Fotografia núm. 2.- Conidios del género Arthrini la flecha indica la presencia de un conidio atípico.



Fotografía núm. 3.- Clamidosporas en cadena presentes en cepas
del gener: Arthrrium.



Fotografia núm. 4.- Conidio del género Arthrini germinando.



Fotografía núm. 5.- Conidios y células conidiógenas típicas del género Arthrimum.

En su sustrato natural, Minter, destacó en el año 1985 que la forma de los conidios es típicamente lenticular aunque en algunas especies pueden presentarse morfologías diversas: elipsoidales, alargados, poligonales, rectangulares, curvados, entre otras. Asimismo, las especies de Arthrinium originan conidios aparentemente deformes o anómalos que son de color marronáceo claro. Estos conidios anómalos tienen su origen en la fragmentación de las hifas que se separan y dispersan y poseen la capacidad de formar nuevas colonias. La proporción entre estas formas no clásicas y las consideradas normales es muy variable según la cepa en estudio.

Las cepas de Arthrinium presentan abundante esporulación al crecer en diversos medios de cultivo y según Domsch y cols., 1980:

"La formación de conidios se ve favorecida si se someten las colonias a irradiación ultravioleta suave".

Asimismo mencionan la capacidad de varias cepas de descomponer la celulosa.

Actualmente se aceptan veintiocho especies del género Arthrinium:

Arthrinium caricicola Kunze, 1817, Mykol. Hefte 9

Arthrinium puccinioides Kunze, 1823, Mykol. Hef., 2: 103

Arthrinium sporophleum Kunze, 1823, Mykol. Hefte 2: 104

Arthrinium morthieri Fuckel, 1870, Symb. Mycol.: 357

Arthrinium sphaerospermum Fuckel, 1873, Symb. Mycol. Natchtr. 3: 79

Arthrinium anamorfo de Apiospora montagnei (Arthrinium arundinis (Corda 1838) Dyko y Sutton 1879) Saccardo, 1875, Nuovo G. Bot. Ital. 7: 306

Arthrinium ushuvaiense Spegazzini, 1887, Bol. Acad. Nac. Cienc. Córdoba 11: 103

Arthrinium kamschaticum Tranzschel y Woronin, 1914, Bot. Otd. 2: 537-576

Arthrinium saccharicola Stevenson, 1917, J. Dep. Agric. P. Rico 1:223

Arthrinium cuspidatum Hohnel, 1925, Mitt. Bot. Inst. Tech. Hochsch Wien, 2(1): 15

Arthrinium anamorfo de Pseudoguignardia scirpi (Arthrinium curvatum Kunze) Gutner, 1927, Mat. Mikol. Fitop. Ross., 6: 311

Arthrinium curvatum Kunze var. minus Ellis, 1951, Trans. Brit. Mycol. Soc. 34: 501

Arthrinium lobatum Ellis, 1963, Mycol. Pap. 87: 21

Arthrinium spegazzinii Subramanian, 1965, Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B, 44: 124

Arthrinium euphorbiae Ellis, 1965, Mycol. Pap. 103: 6

Arthrinium phaeospermum Ellis (comb. nov.), 1965, Mycol. Pap. 103: 8

Arthrinium urticae Ellis, 1965, Mycol. Pap. 103: 16

Arthrinium luzulae Ellis, 1965, Mycol. Pap. 103: 18

Arthrinium sacchari (comb. nov.), 1965, Mycol. Pap. 103: 8

Arthrinium fuckelii, Gjaerum, 1967, Nytt. magasin for Botanik 14

Arthrinium japonicum Pollak y Benjamin, 1969, Mycologia 61(1): 187

Arthrinium muelleri Ellis, 1976, More Dematiaceous Hyphomycetes: 447

Arthrinium aureum Calvo y Guarro, 1980, Trans. Brit. Mycol. Soc. 75(1): 156-157

Arthrinium globosum Koskela, 1983, Karstenia 23: 13-14

Arthrinium marii Larrondo y Calvo, 1990, Mycologia 82: 396-398

Arthrinium serenensis Larrondo y Calvo, 1990, Mycologia 82: 396-398

Arthrinium mediterranii Larrondo y Calvo, 1992, Mycologia 84: 475-478

Arthrinium hispanicus Larrondo y Calvo, 1992, Mycologia 84: 475-478

Las especies del género Arthrinium están ampliamente distribuidas en los más diversos hábitats, por lo que se pueden considerar de distribución cosmopolita, aunque son fundamentalmente saprófitas o parásitas de la célula vegetal, particularmente se desarrollan sobre Gramíneas, en las que pueden producir gran número de conidios que se observan como masas negruzcas.

La presencia de cepas del género en estudio en suelos y arenas es de importancia secundaria.

El mecanismo de dispersión de los conidios es violento, según describió Webster en el año 1966 y a él puede contribuir la acción del viento, de los insectos o de los moluscos.

1.3. EL ESTADO TELEOMORFICO

El anamorfo Arthrinium ha sido correlacionado con varios teleomorfos. En el año 1925 von Hohnel sugirió que las formas-especie de Papularia eran los estados conidiales de Apiospora y Rhopographus. Seis años después, Petrak, indicó que Papularia arundinis era la forma conidial de Apiospora montagnei. Sin embargo estos investigadores no demostraron experimentalmente sus hipótesis.

La primera conexión demostrada experimentalmente entre el anamorfo y el teleomorfo de Arthrinium fue realizada por Gutner en el año 1927, ya que al cultivar la especie anamorfa Arthrinium curvatum sobre tallos esterilizados de varios vegetales, obtuvo los estados anamórficos y teleomórficos. El estado teleomórfico, sólo fue observado en cultivo y se denominó Pseudoguignardia scirpi.

Ellis et al. en el año 1965, obtuvieron el teleomorfo de Arthrinium curvatum var. minus similar a Pseudoguignardia scirpi, pero caracterizado por poseer las ascosporas de tamaño menor y más curvadas. Únicamente fue posible obtenerlo en cultivo de laboratorio y no en condiciones naturales.

La especie Pseudoguignardia scirpi se incluye entre los Ascomycetos unitunicados del Orden Sphaeriales. Autores como Muller et al. (1962), Ainsworth (1976) y von Arx (1981) consideran a este género como sinónimo de Physalospora Niessl, mencionándolo como el teleomorfo correspondiente al anamorfo Papularia, aunque otros micólogos entre los que destacan Kendrick (1979) y Domsch (1980), continúan citando a ambos teleomorfos separadamente y como teleomorfos del género Arthrinium.

En el año 1963 Hudson observó ascosporas y ascocarpos de Apiospora montagnei sobre restos de Saccharum officinarum y Bambusa vulgaris. A partir de la germinación de estas ascosporas en un medio de cultivo con harina de avena, consiguió obtener un estado conidial, que identificó como Papularia arundinis. Posteriormente, en 1976, Hudson et al. a partir de ascosporas de Apiospora sp., aisladas de Arundinaria anceps y Pseudosasa japonica, obtuvo, sobre medios de cultivo, el anamorfo Papularia sphaerospermum, aportando nuevos datos acerca de la relación entre el anamorfo Papularia = Arthrinium y el teleomorfo Apiospora. Asimismo, constató que en la Naturaleza pueden coexistir los dos estados sobre el mismo huésped, pero nunca logró obtener el teleomorfo en cultivos de laboratorio.

El género Apiospora es el único entre los Ascomycetes que en su fase anamorfa posee una conidiogénesis de tipo basáuxico y no se ha encontrado ningún otro tipo de conidiogénesis asociada a este teleomorfo ya que Arthrinium, Pteronidium, Cordella, Scyphospora y Nigrospora, aceptados como anamorfos asociados a Apiospora, típicamente presentan este tipo de formación de los conidios.

Las ascosporas del género Apiospora se caracterizan por ser bicelulares. Poseen un septo que delimita dos células, una superior de mayor tamaño y otra basal o inferior. En este género se incluye un reducido número de especies, la mayoría de ellas tienen como hospedadores a especies de las Familias Poaceae y Ciperaceae.

La especie relacionada directamente con Arthrinium es Apiospora montagnei. Fue descrita por Saccardo en el año 1875. Los ascocarpos de Apiospora montagnei se desarrollan, generalmente en los entrenudos de los tallos de Bambusa vulgaris y sobre hojas de Saccharum officinarum. Los ascocarpos son inicialmente globosos, pero al madurar presentan una zona lateral comprimida. Miden de 130 a 200 μm de diámetro, poseen cuellos de 75 a 100 μm de longitud y un espesor de pared entre 16 y 25 μm . Los ascos son unitunicados, aunque al ser observados al microscopio óptico parecen bitunicados, a consecuencia del grosor de la pared. Las ascosporas son hialinas o de color amarillo. Se presentan en número de ocho y están rodeadas de numerosas parafisis filiformes. Son ascosporas bicelulares y poseen el septo a una distancia entre 4 y 6 μm de la base de la ascospora. Miden de 21.5 a 27 μm de longitud por 8 a 9 μm de grosor, son piriformes y curvadas.

1.4. METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GENERO ARTHRIINIUM

El estudio de los metabolitos secundarios elaborados y acumulados por especies del género Arthriniium o por cepas en su estado teleomórfico, pertenecientes al género Apiospora se iniciaron con los estudios de Aldridge y cols. (datos no publicados).

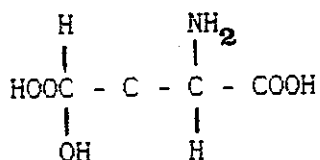
En el año 1975, Ishiyama y cols. , consiguieron establecer las propiedades físico-químicas del metabolito aislado a partir de la cepa T-53 de Arthriniium phaeospermum concluyendo que se trataba de una sustancia identificable con la 1-treo- β -hidroxiaspártico. Estos mismos investigadores señalaron que este aminoácido posee capacidad inhibidora del crecimiento de Bacillus subtilis y otros esporulados Gram positivos, de cepas de Staphylococcus aureus, de Escherichia coli, de Mycobacterium smegmatis e incluso de Botrytis cinerea y de Mucor, levaduras y otros Deuteromycotina.

En el mismo año van Eijck, describió la producción de un pigmento antraquinónico y otros metabolitos secundarios procedentes de la misma especie. A través de la naturaleza de estos pigmentos, el autor establece correlaciones que facilitan la situación taxonómica del género Arthriniium respecto a otros hongos miceliares.

Los metabolitos aislados y las especies que los producen y acumulan se resumen en la Tabla siguiente.

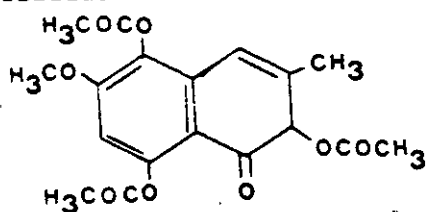
METABOLITO

MICROORGANISMO PRODUCTOR



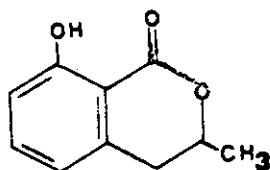
Arthrinium phaeospermum

1-treo- -hidroxiaspartico



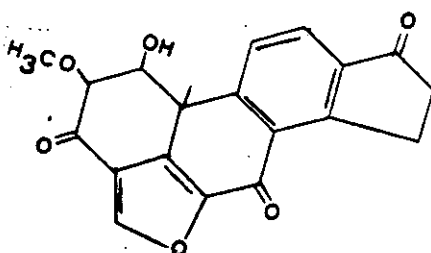
Arthrinium phaeospermum

Bostricina



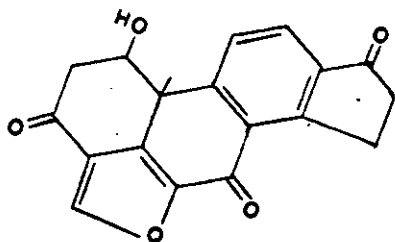
Apiospora camptospora

4-hidroximelleína



Apiospora camptospora

Viridina

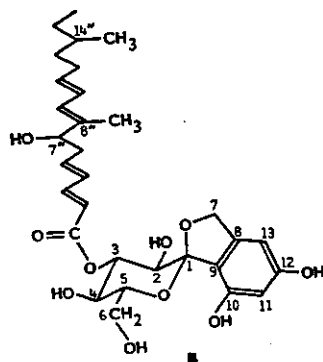
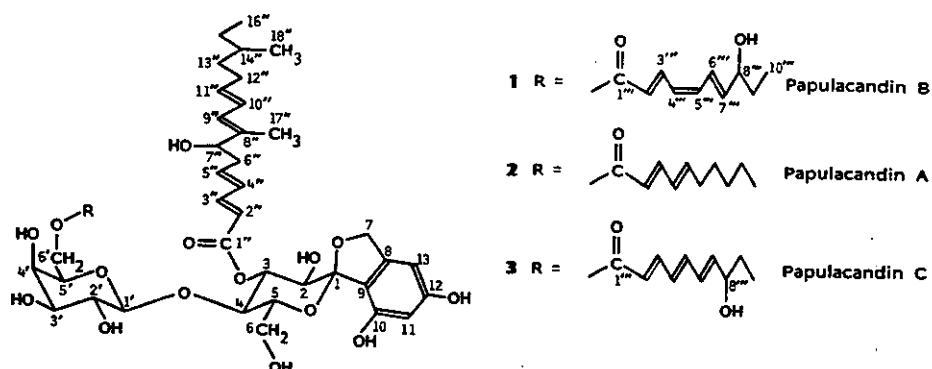


Apiospora camptospora

Desmetoxiviridina

Junto a los metabolitos citados podemos destacar la Familia de la Papulacandinas, cuya fórmula y derivados se indican a continuación.

Traxler en el año 1977, determinó la existencia de una nueva Familia de metabolitos secundarios con actividad antibiótica, proveniente de Arthrinium phaeospermum a la que denominó Papulacandinas. Estas sustancias han sido clasificadas en A,B,C,D y E, demostrándose que poseen actividad antibiótica frente a levaduras, pero que son inactivas frente a hongos filamentosos, bacterias y protozoos. Se ha comprobado, además, que esta Familia de antibióticos poseen baja toxicidad, pero su posible utilización en clínica se ve dificultada por el hecho de que se unen activamente a componentes del suero humano con lo que su efecto inhibitorio real decae enormemente debido a que las Papulacandinas administradas, difícilmente pueden alcanzar su lugar de actuación. Sin embargo, estas sustancias podrían ser utilizadas, dada su actividad "in vitro" como potenciadores de crecimiento en animales, pudiendo pasar a incrementar la reducida lista de antimicrobianos de uso permitido en Veterinaria.



Asimismo podemos señalar la 4-hidroximelleína que bajo la denominación de ochraceína ha sido obtenida a partir de cepas del género Aspergillus concretamente de Aspergillus ochraceus y Aspergillus melleus. este metabolito es poco tóxico pero se caracteriza por ser precursor de las ochratoxinas, de características perfectamente establecidas.

La viridina y la desmetoxiviridina han sido aisladas en otros géneros de Deuteromycotina de estructuras morfológicas muy distintas a las que caracterizan al género Arthrinium concretamente se citan especies de los géneros Trichoderma y Gliocladium entre los hongos elaboradores y acumuladores de estos metabolitos.

Estos metabolitos son pigmentos de color amarillo que se obtienen principalmente al cultivar las cepas en medios de laboratorio que contengan glucosa y sales amónicas. Bajo el punto de vista de su actividad biológica son agentes antibióticos y fungistáticos.

Finalmente podemos señalar la producción de esteroides y de componentes fenólicos no identificados.

2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Uno de los aspectos del metabolismo fúngico que está centrando el interés de diversos grupos de investigadores en los últimos años es el estudio del metabolismo secundario de los hongos filamentosos.

La determinación de la importancia y posible utilidad de algunos metabolitos secundarios elaborados y acumulados por cepas del género Arthrinium es un modelo de estudio del comportamiento de hongos dematiáceos de amplia distribución en nuestro medio ambiente.

Por ello y establecidos en estudios anteriores (Larrondo, 1989; Agut, 1992) la influencia de diversos factores microambientales en la producción y acumulación de metabolitos secundarios activos por parte de cepas del género Arthrinium, básicamente en cultivos en medio sólido, establecemos las siguientes Hipótesis de trabajo:

H0: "La producción de metabolitos secundarios en cepas del género Arthrinium se ve modificada por acción de agentes mutagénicos o por variaciones morfológicas asociadas a partículas semejante a virus".

H1: "La producción de metabolitos secundarios en cepas del género Arthrinium no se ve modificada por acción de agentes mutagénicos ni por variaciones morfológicas asociadas a partículas semejantes a virus".

Con el fin de poder establecer cual de las anteriores hipótesis de trabajo se corresponde con el patrón de actuación de las cepas del género Arthrinium en estudio se ha desarrollado el siguiente Plan de Trabajo:

- 1.- Elección de las cepas del género Arthrinium.
- 2.- Elección de los microorganismos sobre los que se ensayará la actividad antibiótica.
- 3.- Elección de las metodologías a utilizar.
- 4.- Inducción de mutagénesis.
- 5.- Detección y evaluación de los metabolitos activos.
- 6.- Estudio de actividad sobre células eucariotas y procariotas.
- 7.- Selección de cepas superproductoras de metabolitos.
- 8.- Determinación de la presencia de partículas semejantes a virus en las cepas activas y con alteraciones morfológicas manifiestas.
- 9.- Evaluación de los resultados.

3. MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. ELECCION DE MICROORGANISMOS

Las especies del género Arthrinium utilizadas en la realización del presente estudio fueron aisladas de diversos hábitats y estaban depositadas en la Colección de Cultivos de la Facultad de Veterinaria (FVB) de la Universidad Autónoma de Barcelona.

La relación de especies así como el número de cepas de cada una de ellas, se resume en la TABLA núm.1

Con el fin de poder comprobar la actividad inhibidora de las cepas ensayadas o de sus metabolitos se han elegido varias especies de bacterias, hongos filamentosos y levaduras de interés en clínica por su actividad patógena o por su interés como habituales contaminantes a nivel atmosférico o industrial.

La relación de los mismos se aporta en la TABLA núm. 2.

ESPECIE	NUMERO DE CEPAS
<u>Arthrinium aureum</u>	5 (A1-A5)
<u>Arthrinium arundinis</u>	5 (A6-10)
<u>Arthrinium francii</u>	1 (A11)
<u>Arthrinium georgii</u>	1 (A12)
<u>Arthrinium hispanicus</u>	2 (A13-A14)
<u>Arthrinium javii</u>	1 (A15)
<u>Arthrinium marii</u>	5 (A16-A20)
<u>Arthrinium mediterranii</u>	2 (A21-A22)
<u>Arthrinium phaeospermum</u>	5 (A23-A27)
<u>Arthrinium philippi</u>	1 (A28)
<u>Arthrinium puccinoides</u>	5 (A29-A33)
<u>Arthrinium saccharicola</u>	5 (A34-A38)
<u>Arthrinium serenensis</u>	3 (A39-A41)
<u>Arthrinium urticae</u>	5 (A42-A46)

Tabla número 1.- Relación de especies del género Arthrinium investigadas, indicando el número de cepas de cada una de ellas.

TABLA número 2.- Relación de bacterias, hongos filamentosos y levaduras frente a los que se ha ensayado la actividad de las cepas del género Arthrinium.

BACTERIAS

Staphylococcus aureus ATCC 9144

Bacillus cereus FVB 5342

Escherichia coli ATCC 10536

Streptococcus faecalis ATCC 10541
(Enterococcus faecalis)

Enterobacter cloacae FVB 6789

Serratia marcescens ATCC 8412

Klebsiella pneumoniae ATCC 13883

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

HONGOS FILAMENTOSOS

Penicillium corylophilum FVB 403

Aspergillus niger FVB 404

Aspergillus flavus FVB 410

Aspergillus fumigatus FVB 413

LEVADURAS

Candida albicans CECT 1001

3.2. METODOS

3.2.1. Métodos para detectar la actividad inhibidora de los extractos de las cepas.

3.2.1.1. Obtención de los extractos crudos y determinación del período óptimo de producción de metabolitos activos.

Las cepas del género Arthrinium se cultivaron en extracto de malta al 2% a 28°C en agitador y a 190 rpm. El período de incubación se estableció, para este ensayo en 21 días, tomando muestra cada 24 horas, con el fin de poder determinar el período de incubación óptimo para la detección de metabolitos con capacidad inhibidora.

En cada toma de muestras se procedió a la filtración del micelio a través de gasa estéril, con el fin de separar el micelio y finalmente por filtración por membrana de 0.22 μ m con el fin de asegurar la esterilidad del extracto obtenido.

El extracto se recogía en tubos estériles y se procedía a la realización de ensayos de actividad frente a los microorganismos elegidos.

Para ello se seguía el proceso esquematizado en la Fig. núm. 3.

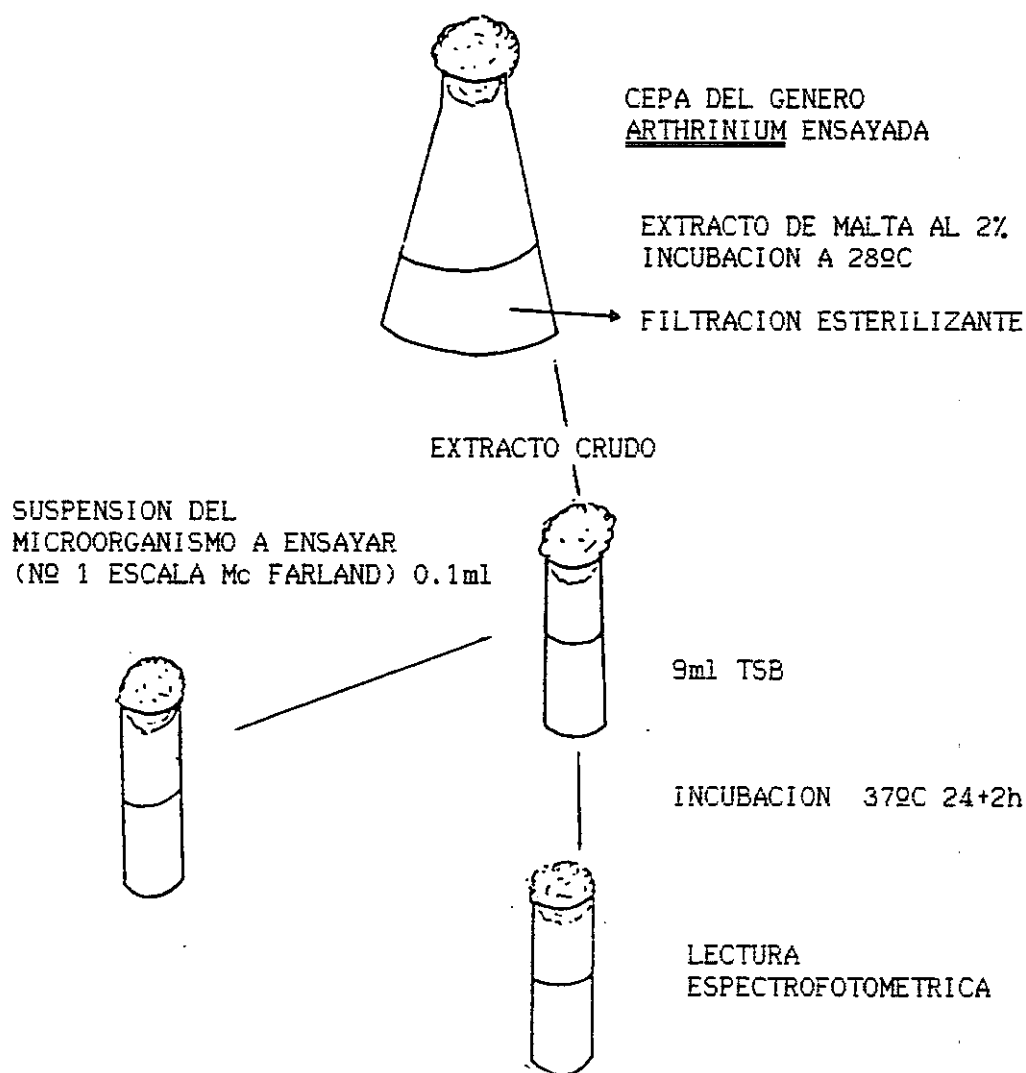


Fig. núm. 3.- Esquema del proceso seguido para determinar la actividad inhibidora de los extractos obtenidos a partir de las cepas del género Arthrinium.

A partir de tubos de ensayo que contenían 9 ml de TSB en el caso de ensayos frente a bacterias y de caldo glucosado de Sabouraud al 2%, en el caso de las levaduras, se añadía 1 ml del extracto crudo obtenido, como se ha señalado anteriormente, y al que se añadía 0.1 ml de una suspensión del microorganismo a ensayar, obtenida en suero fisiológico estéril a partir de cultivos recientes del mismo.

La suspensión se preparaba a una concentración de 10^8 UFC/ml.

Paralelamente se realizan ensayos en blanco con el fin de poder determinar el desarrollo de las cepas en los medios de cultivo sin adición del extracto crudo.

Finalizado el período de incubación se llevaron a cabo lecturas del ensayo en espectrofotómetro, anotando los resultados obtenidos en absorbancias a 805nm, máximo de absorbancia determinado previamente como el óptimo para el medio de cultivo sin inoculación previa.

Si las cepas del género Arthrinium habían elaborado sustancias difusible con capacidad inhibidora, éstas actúan sobre los microorganismos ensayados y se observará inhibición del crecimiento en los tubos de ensayo, detectable por las lecturas espectrofotométricas realizadas.

La capacidad inhibidora puede ser cuantificada mediante las lecturas espectrofotométricas, evaluando los resultados de absorbancia detectados en el ensayo control y el realizado con el extracto objeto de nuestro estudio.

Aplicando la fórmula propuesta por Candeli, y cols., 1978 podemos expresar los resultados como porcentaje de inhibición.

$$\% \text{ LISIS} = \frac{\text{Ab} - \text{Ap}}{\text{Ab}} \times 100$$

Ab = Absorbancia del ensayo control

Ap = Absorbancia del ensayo problema

3.2.1.2. Relación entre la curva de crecimiento de las cepas del género Arthrinium y la producción y acumulación de sustancias antimicrobianas.

La curva de crecimiento de las cepas del género Arthrinium se realizó a partir de matraces de 99 ml de extracto de malta al 2% a los que se inoculó un ml de una suspensión valorada de la cepa en estudio. La concentración es del orden de 10^8 blastoconidios viables por ml. Los matraces se incubaron en agitación a 190 rpm y a 28°C.

Las lecturas se realizaron a las 24h, 48h, 72h y a partir de esta lectura cada 12 horas hasta alcanzar las 180 horas de iniciado el cultivo.

La determinación del peso seco, se llevó a cabo tras filtración de los cultivos y sometiendo a sequedad y en estufa hasta peso constante el micelio obtenido.

Los extractos crudos se utilizaron para evidenciar la actividad antimicrobiana, siguiendo el proceso descrito anteriormente.

3.2.1.3. Purificación de los metabolitos secundarios con capacidad antimicrobiana constituyentes del extracto crudo.

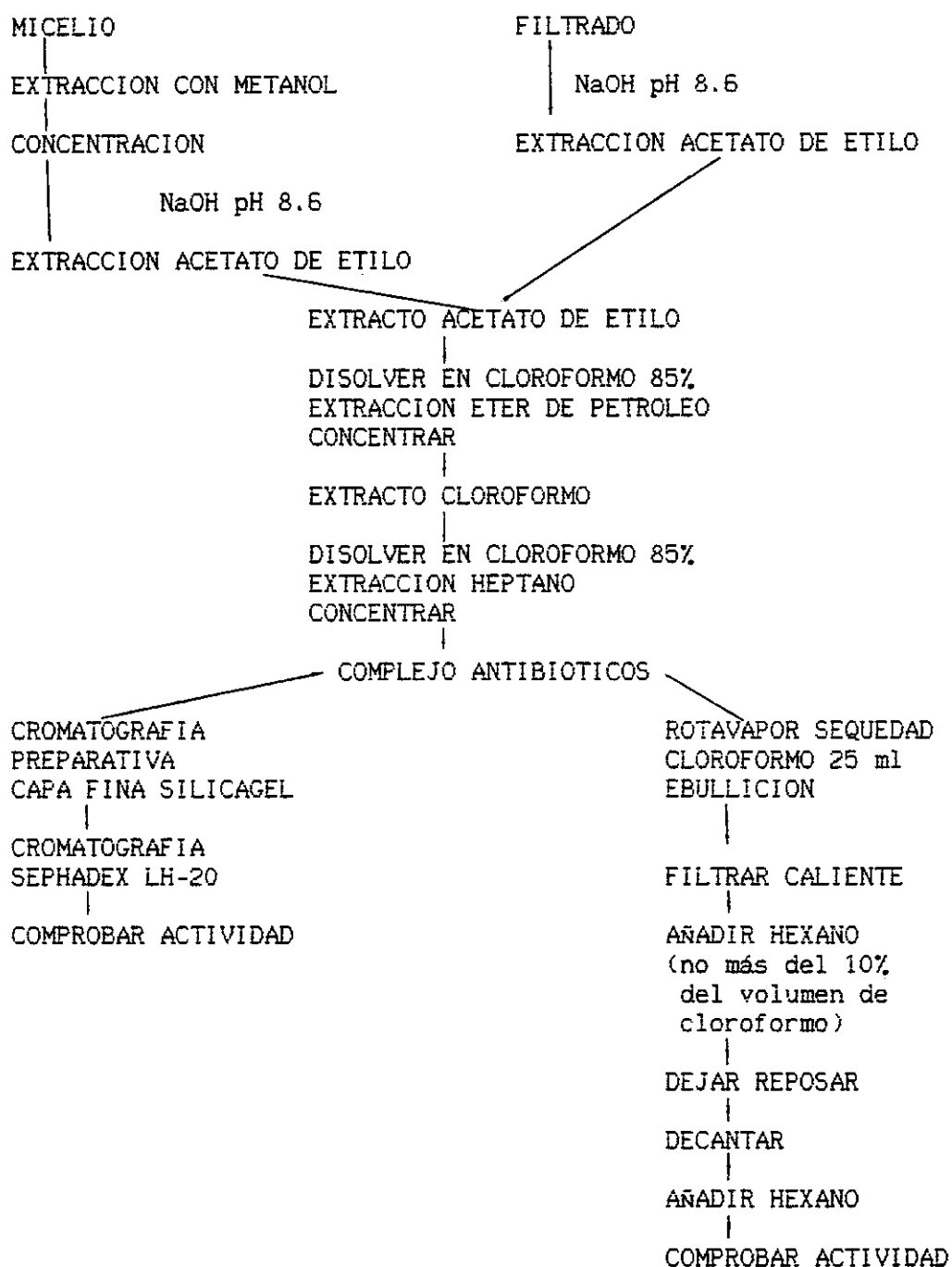
Obtenido el extracto crudo, se procedía al tratamiento del mismo con el fin de poder determinar cual o cuales de las fracciones constituyentes del mismo son las responsables de la actividad antimicrobiana.

El método seguido para el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios elaborados y acumulados por las cepas del género Arthrinium en estudio es el descrito por Taxhler y cols., 1977.

Filtrado el cultivo, el proceso seguido se resume en el Esquema núm. 1.

A partir de las fracciones obtenidas se realizaron cromatografías en capa fina, sobre Silicagel Merck con el fin de establecer los Rf de los productos detectados.

Asimismo se llevó a cabo la realización de las bioautografías con el fin de determinar cual o cuales son las fracciones con actividad antibiótica.



ESQUEMA núm. 1.- Analítica para la separación de componentes del extracto y del micelio y comprobación de actividad antibiótica.

3.2.1.4. Método para realizar bioautografías.

Realizadas las cromatografías en capa fina se depositaron sobre placas de Petri estériles de 20 cm de diámetro y se recubren con el medio de cultivo adecuado según se desee estudiar la actividad sobre bacterias, sobre levaduras o bien sobre hongos filamentosos.

Para estudiar la actividad sobre bacterias, el medio de cultivo elegido fue Mueller-Hinton, en el caso de hongos filamentosos y de levaduras el medio de cultivo sería agar extracto de malta al 2%. Antes de verter el medio de cultivo sobre las placas se incluye en él, el microorganismo sobre el que se desea conocer la actividad de los extractos objeto de estudio. A continuación se dejan solidificar las placas y se incuban a 37°C por espacio de 24-48 h en el caso de las bacterias y a 28°C durante 24 horas para levaduras y a 28°C durante cinco días en el caso de los hongos filamentosos.

La lectura se realizó detectando la presencia de zonas de inhibición alrededor de las zonas en las que se hallaban los metabolitos activos. En caso de lecturas dudosas se utilizan colorantes vitales, para diferenciar las zonas en las que había crecimiento, de aquellas en las que éste había sido inhibido.

En todos los casos se llevaron a cabo ensayos control. En este estudio solamente se realizaron bioautografía sobre Staphylococcus aureus ATCC 9144.

3.2.1.5. Método para determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto crudo total y de los componentes activos sobre bacterias y levaduras.

El método seguido para determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto crudo completo y de los componentes activos es una modificación del descrito por Lennette y cols., 1980.

A tubos de ensayo que contienen 9 ml de caldo trip-ticosa soja (TSB) previamente esterilizados, se adicionan a cada tubo 0.1 ml de una suspensión del microorganismo en ensayo cuya concentración es equivalente al nº 1 de la escala de McFarland. Preparados los tubos de ensayo se adicionan concentraciones crecientes del extracto crudo completo o de los componentes de actividad demostrada previamente sobre el microorganismos en estudio.

A continuación y previa homogenización de los tubos se incuban a 37°C durante 24 ± 2 horas y transcurrido este período de tiempo se procede a realizar las lecturas del ensayo, observando para cada serie de tubos inoculados con las concentraciones de los productos, cual es la concentración mínima de los mismos que es capaz de inhibir el desarrollo de cada uno de los microorganismos estudiados.

En todos los casos se realizaron paralelamente ensayos control para validar los resultados.

3.2.1.6. Método para detectar la actividad inhibidora de los metabolitos obtenidos sobre la germinación de hongos filamentosos.

El método utilizado se basa en las investigaciones realizadas por McKallan y Willcoxon, 1940, Kollmorgen y Jones, 1975.

A partir de los metabolitos obtenidos, se procede a poner en contacto 0.1 ml del metabolito o del extracto crudo completo con 0.1 ml de una suspensión de conidios del hongo en estudio previamente valorada y establecida en 10^8 conidios por ml.

La prueba se realiza sobre portaobjetos excavados y tras la incubación durante 24 y 48 horas a 28°C se realizan lecturas de la germinación observada, comparando los resultados con ensayos control, preparados de forma análoga a los que no se añade el metabolito o el extracto en estudio.

Los resultados se expresan aplicando la fórmula citada por Candeli et al., 1978 que en este caso nos permitirá conocer el porcentaje de inhibición de la germinación respecto al ensayo en blanco.

Dadas las características de los microorganismos ensayados paralelamente a los estudios de germinación se pueden observar otros dos parámetros: inhibición de la formación de micelio abundante e inhibición de la formación de cabezas conidiales.

3.2.1.7. Método para detectar la actividad de los metabolitos sobre larvas de Artemia salina L.

El método utilizado es una modificación del descrito por Harwig y Scott, 1971.

El objetivo de este método es detectar la actividad letal del extracto crudo y de los metabolitos obtenidos sobre larvas de Artemia salina L.

En un medio de cultivo líquido, descrito por Harwig y Scott, 1971, de composición similar al agua de mar, se depositan entre 100 y 200 mg de huevos de Artemia salina L. que se incuban a 30°C por espacio de 30 a 48 horas. Posteriormente se separan las larvas de los huevos sin eclosionar mediante la utilización de un foco luminoso, hacia el cual tienen tendencia a desplazarse por tropismo las larvas de Artemia salina L.

Separadas las larvas se colocan en un portaobjetos excavado un número conocido de las mismas, el número elegido debe ser entre 30 y 40 larvas y se añaden 0.1 ml o 0.2 ml del extracto o del metabolito en estudio.

Cada ensayo se realiza por duplicado.

Se incuban los portaobjetos a 28°C y se establecen lecturas a las 4h, 8h, 12h y 24h de iniciado el ensayo.

En todos los casos se llevan a cabo ensayos control, pudiendo expresar los resultados como porcentaje de mortalidad de las larvas de Artemia salina para cada período de incubación, comparando con los controles.

- 3.2.1.8. Método para detectar al microscopio electrónico de barrido las variaciones morfológicas producidas por el extracto crudo de las cepas del género Arthrinium en estudio.

El objetivo de este apartado es detectar las posibles variaciones que producen los extractos crudos en ensayo sobre la morfología de los microorganismos.

Se tomaron con pipeta estéril y previa agitación mecánica, cuatro ml del extracto crudo que durante 5 minutos fueron sometidos a centrifugación. Posteriormente se decantó el sobrenadante y el residuo obtenido se lavó con solución salina estéril, repitiendo el proceso de centrifugación y lavado un mínimo de tres veces consecutivas.

Este proceso permite eliminar los restos de medio de cultivo. En el último proceso de centrifugación se añaden a los tubos de centrifuga 2 ml de tetróxido de osmio con el fin de proceder a la fijación del material celular. Se deja actuar el fijador durante dos horas y posteriormente a la centrifugación se elimina el sobrenadante.

El precipitado celular se recupera depositándose una alícuota del mismo sobre filtro Millipore de 0.22 μm y dejándolo secar al aire. Posteriormente se somete cada preparación al proceso necesario para poder ser visualizado al microscopio electrónico de barrido.

En todos los ensayos se realizaron estudios control para poder detectar las posibles alteraciones morfológicas de los microorganismos.

3.2.1.9. Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) y de infrarrojos (IR).

Detectados los componentes activos se recuperaron de las cromatografías y tras purificación se procedió a la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Una alícuota de la fase clorofórmica se analiza en el entorno ^1H RMN a 360 MHz y a ^{13}C RMN a 90.55 MHz, ambos en deuterocloformo mediante un equipo Bruker WH 360.

Asimismo se realizaron espectros de infrarrojo.

A partir de los resultados obtenidos se pudieron establecer los principales componentes activos del extracto estudiado.

3.2.1.10. Métodos para observar la acción de agentes mutagénicos sobre la producción de metabolitos secundarios activos en cepas del género Arthrinium.

Con el fin de poder mejorar el rendimiento de producción de los metabolitos activos elaborados y acumulados por cepas del género Arthrinium en estudio se ensayó la acción de dos agentes mutágenos sobre las cepas productoras.

Los agentes mutágenos elegidos fueron:

a.- N- Metil-N'-Nitrosoguanidina.

b.- Luz ultravioleta.

El efecto de las radiaciones ultravioleta de longitud de onda de 254 nm y una intensidad de radiación de 590 $\mu\text{W}/\text{cm}$ a 15 cm. Para efectuar el tratamiento la cámara se situaba a 5 cm de la placa. Los tiempos de exposición a la luz u.v. fueron de 5, 10 o 20 minutos.

Para ensayar la actividad mutágena de la Nitrosoguanidina, se siguió la metodología descrita por Avalos y cols., 1985.

La concentración final de Nitrosoguanidina en el medio fue de 1mg/ ml. El tratamiento mutagénico se inactivaba al cabo de una hora de haberse iniciado por la adición de 1 ml de cisteína al 0.1% en acetona.

Las suspensiones tratadas, se inoculaban posteriormente en agar extracto de malta al 2%, cultivándose a 28°C durante siete días. Transcurrido este periodo de tiempo se estudiaban las características macroscópicas y microscópicas así como la posible variación en la actividad antimicrobiana de las cepas sobre los microorganismos ensayo, citados anteriormente, realizando el ensayo por la técnica de Campbell, 1957. Los estudios se realizaron siempre frente a controles.

En el caso de las radiaciones ultravioletas se sometieron a éstas, suspensiones previamente valoradas de conidios de las cepas en estudio. Tras diversos tiempos de actuación (5, 10 o 20 minutos), se sembraron en placa las suspensiones tratadas, detectando la capacidad letal de la radiación ultravioleta o en su caso las variaciones que sobre la actividad inhibidora presentan las cepas tratadas.

En todos los estudios se realizaron ensayos control.

Un aspecto fundamental en la obtención de mutantes es determinar el recuento de supervivientes. Para ello, se realizaban recuentos de UFC/ml a partir de las suspensiones de conidios, antes y después del tratamiento mutagénico, pudiendo establecerse en cada caso el índice de supervivencia como resultado de la aplicación de la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de supervivencia: } \frac{\text{UFCi/ml}}{\text{UFCm/ml}} \times 100$$

UFCi/ml: Unidades Formadoras de Colonias previo tratamiento con el agente mutagénico/ml,

UFCm/ml: Unidades Formadoras de Colonias tras el tratamiento con el agente mutagénico/ml.

Para la identificación de las mutantes se tuvieron en cuenta las características siguientes:

- a.- Modificaciones del aspecto macroscópico de las colonias.
- b.- Cambios cualitativos o cuantitativos en la capacidad antibiótica de las cepas.

3.2.1.11. Determinación de la posible presencia de partículas semejantes a virus en cepas de Arthrinium y su relación con la capacidad inhibidora de las cepas en estudio.

Para poder determinar la posible presencia de partículas semejantes a virus, en las cepas en estudio es preciso llevar a cabo un análisis de la ultraestructura del género Arthrinium, eligiéndose para ello cultivos puros de las cepas aisladas en los diversos estudios ecológicos y procedentes de Colecciones de Cultivo Internacionales.

Con el fin de obtener cultivos homogéneos, se prepararon suspensiones de conidios valoradas a partir de cada una de las cepas de colección citadas, siguiendo la metodología que se expone a continuación.

Las cepas se sembraron en frascos de Roux, que contenían agar extracto de malta al 2%, manteniéndose por espacio de catorce días en estufa de cultivos, a 28°C. Transcurrido este período de incubación y previa confirmación de la identificación, se procedía a arrastrar los conidios mediante perlas de vidrio esterilizadas de 3 mm de diámetro. La suspensión se filtró a través de gasa estéril y se conservó en tubos de vidrio con tapa roscada, previamente esterilizados.

La valoración de la suspensión se llevó a cabo por la técnica de recuento en placa de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C), ajustándose la concentración de conidios viables a 10^8 U.F.C./ml

De esta suspensión valorada se sembraron 0.1 ml, por la técnica de agotamiento en superficie mediante el asa de Digrafsky, en placas de Petri de 90 mm de diámetro, que contenían como medio de cultivo, 20 ml de agar extracto de malta al 2%, medio óptimo para

el desarrollo y esporulación adecuada de los Hyphomycetes dematiáceos, según indican diversos autores. Las placas se incubaron a 28°C y las muestras de los cultivos fueron obtenidas a los cinco, siete y catorce días de desarrollo, separando bloques del cultivo de 1.5 x 1.5 x 1.0 mm, para su posterior procesamiento.

La zona de obtención de los bloques se seleccionaba tras la observación de las colonias mediante el microscopio estereoscópico, eligiendo de las placas que presentaban un crecimiento uniforme, aquella zona en la que la presencia de conidios era máxima.

Paralelamente, y a partir de las suspensiones valoradas, se realizaron cultivos en frascos de Roux, con agar extracto de malta al 2%, con el fin de preparar una suspensión de conidios a los catorce días del desarrollo de la cepa a 28°C. Los conidios se arrastraban mediante la ayuda de perlas de vidrio estériles, preparándose una suspensión en suero fisiológico estéril. La suspensión se filtraba a través de gasa estéril, con el fin de eliminar los restos de micelio que se habían podido arrastrar junto con los conidios. La suspensión se conservaba en tubos estériles hasta su procesamiento para la observación al microscopio electrónico.

Una alícuota de la suspensión era sometida a incubación durante 24-48h a 28°C, en extracto de malta al 2%, con el fin de poder observar el proceso de germinación en sus distintos estadios.

- Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras obtenidas según los diversos procedimientos anteriormente citados, fueron fijadas con glutaraldehído al 2%, tamponado con cacodilato sódico 0.1 M. El pH de la solución se ajustó a 7.4 y los tiempos de fijación oscilaron entre 2 a 24 h, a 4°C.

Finalizada la fijación primaria, se lavaban las muestras durante 15 minutos, con la solución tampón, para eliminar el exceso de fijador. La postfijación se realizó con tetróxido de osmio al 1%, en el mismo tampón utilizado para el glutaraldehído, durante un periodo de 2 a 18h, a 49C en oscuridad.

Fijadas las muestras con tetróxido de osmio, las muestras se lavaron nuevamente con la solución tampón. A continuación se procedió a la deshidratación de las muestras con alcohol etílico al 30%, 50%, 70%, 90% y 95% sumergiéndolas 15 minutos en cada una de las concentraciones de alcohol, para mantenerlas finalmente durante una hora en alcohol etílico purísimo, renovándolo cada 20 minutos. El paso final se realiza con óxido de propileno, manteniendo las muestras en él, entre 45 a 60 minutos, renovándolo totalmente cada 15 minutos.

Los medios de inclusión empleados fueron los siguientes:

Epon 812, Araldita y Spurr.

Las muestras tratadas con óxido de propileno al 100%, se sumergieron en mezclas de óxido de propileno y del medio de inclusión, recién preparadas. Las proporciones de óxido de propileno y medio de inclusión así como los tiempos de tratamiento fueron las siguientes:

Oxido de propileno 100%	1 hora
-------------------------	--------

Oxido de propileno: Epon

3:1	1 hora
1:1	2 horas
1:3	4 horas

Epon 100%	2-3 horas
-----------	-----------

Las muestras se sometieron a rotación constante, manteniéndolas a temperatura ambiente. Posteriormente se mantenían las muestras en un desecador, a temperatura de 45°C entre dos a cuatro horas.

Posteriormente, se formaban los bloques que se mantenían durante dos días en estufa a 60°C, con el fin de conseguir la polimerización.

Si las inclusiones se realizaban en araldita, las mezclas preparadas, presentaban la siguiente composición:

Oxido de propileno 100% 1 hora

Oxido de propileno: Araldita

3:1	1-2 horas
1:1	1-2 horas
1:3	1-2 horas

Las mezclas se realizaban a temperatura ambiente y en constante rotación. En una última fase se sometían las muestras durante 1-2 horas, a 45°C con Araldita.

Finalmente, se preparaban los bloques con la misma mezcla de Araldita, recién preparada, dejándola polimerizar durante 2 a 3 días, a 60°C.

Si la inclusión se realizaba en Spurr, las muestras se preparaban por deshidratación en acetona, en lugar de en etanol, pero realizando el mismo tratamiento en lo que a concentración y tiempo de cada paso de deshidratación se refiere. En este caso no se utilizó óxido de propileno y a partir de las muestras en acetona se procedió a iniciar la infiltración con el plástico.

Las proporciones de acetona y mezclas de plásticos fueron las siguientes:

Acetona 100% : mezcla de plásticos

3 : 1 18 horas

1 : 1 2 horas

1 : 3 2 horas

Spurr 100% 4-6 horas a 45°C, renovando el plástico cada dos horas.

Los bloques se dejaban polimerizar en estufa a 60°C, durante dos días.

Todas las muestras se incluyeron en moldes planos de silicona para conseguir una adecuada orientación. Para comprobar que la muestra estaba orientada de forma correcta, se observaba con el microscopio estereoscópico, corrigiéndose con una aguja enmangada, si la disposición del bloque no era la deseada.

A partir de las inclusiones se realizaron cortes semifinos, de 1 μ m de grosor para localizar las mejores zonas de estudio con un ultramicrotomo Reichert Ultracut E, con cuchilla de vidrio. Los cortes se tiñeron con azul de metileno al 0.5% y fueron decolorados con bórax al 0.5%.

Los cortes ultrafinos se realizaron con cuchilla de diamante Diatome, Du Pont, según la técnica de Fernández Morán (1956). Los cortes se recogieron sobre rejillas de cobre de 200 mesh, siendo contrastados con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2% y a continuación tratados con citrato de plomo, según la técnica de Reynolds.

Las observaciones se realizaron utilizando microscopios electrónicos de transmisión, Phillips modelo 200 e Hitachi, modelo HU-12, trabajando a 75 KV y 100 KV.

Las microfotografías se obtuvieron utilizando película Kodak FRP 651 de 35 mm. y Kodak EMF 4489.

- Microscopía electrónica de barrido

Con el fin de poder establecer la posible relación entre las alteraciones morfológicas observadas y la presencia de partículas semejantes a virus en estas zonas, así como evaluar su posible interrelación con la capacidad inhibidora se realizaron estudios al microscopio electrónico de barrido de cepas del género Arthrinium con alteraciones morfológicas notables y que presentaran actividad inhibidora.

A partir de los cultivos puros, obtenidos según se indicó anteriormente, se preparaban discos de cultivo de 6 mm de diámetro que se fijaban manteniéndolos por espacio de cuatro horas en tetróxido de osmio al 1%.

El proceso de deshidratación de las muestras consistía en someterlas a concentraciones crecientes de alcohol etílico hasta llegar a alcohol absoluto, según la metodología descrita en el apartado de preparación de muestras para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

Mantenidas las muestras en alcohol absoluto durante 1-2 horas a temperatura ambiente, éste se iba sustituyendo por acetato de amilo, siguiendo la pauta que se señala a continuación.

Alcohol etílico : Acetato de amilo

3 : 1	45 minutos
2 : 1	45 minutos
1 : 1	45 minutos
1 : 2	45 minutos
1 : 3	45 minutos
1 : 4	45 minutos

Acetato de amilo 100% 60 minutos

Cuando la muestra en estudio era una suspensión de conidios se realizaba el mismo proceso anterior, pero sometiendo la suspensión a centrifugación durante 3 minutos a 4.000 rpm, con el fin de recuperar los conidios en cada proceso.

Para la observación de las muestras al microscopio electrónico de barrido, es preciso eliminar el líquido celular, y para ello se procedió al secado mediante la técnica del punto crítico.

A continuación se montaban sobre portamuestras de aluminio y se añadía plata coloidal para favorecer la conductividad.

Posteriormente, se procedía al metalizado de las muestras utilizando un Sputter coater (Balzers), depositando una capa de oro-paladio de un grosor aproximado de 100 a 200 Å, siguiendo la técnica descrita por Echlin (1975) y Echlin y Kaye (1979). El proceso de metalizado se realizó en tres tiempos siendo el primero más corto y los siguientes de mayor duración, con el propósito de evitar artefactos ocasionados en el caso de calentar excesivamente la muestra, según indica Robards y cols. (1981).

Las observaciones se realizaron utilizando Jeol U-25, Jeol JSM-840 y Cambridge Stereoscan, generalmente a 15- 25 KV y operando a una distancia de trabajo de 15 a 39 mm. Las microfotografías se obtuvieron utilizando película Kodak TRI-X-TMY.

- Relación entre la morfología y la actividad inhibidora.

Para establecer la posible relación entre las modificaciones morfológicas de las cepas, en las que se había detectado la posible presencia de partículas víricas y su actividad antibiótica se eligió la especie Arthrinium mediterranei (A22), dado que presentaba una marcada alteración morfológica y una gran abundancia de partículas semejantes a virus, según pudo ser demostrado en las observaciones bajo microscopio electrónico de transmisión.

La técnica utilizada fue la descrita anteriormente a partir de cultivos en caldo extracto de malta al 2%.

Se ensayó la actividad del cultivo realizado en medio líquido frente a los siguientes microorganismos:

- 1.- Staphylococcus aureus ATCC 9144
- 2.- Streptococcus faecalis ATCC 10541
(Enterococcus faecalis)
- 3.- Bacillus cereus ATCC 9373
- 4.- Bacillus megaterium ATCC 25484
- 5.- Bacillus subtilis ATCC 11774
- 6.- Micrococcus luteus ATCC 4698
- 7.- Micrococcus luteus ATCC 9341
- 8.- Escherichia coli ATCC 10536
- 9.- Aeromonas hydrophila FVB 3008
- 10.- Mycobacterium smegmatis ATCC 14458
- 11.- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
- 12.- Pseudomonas fluorescens ATCC17397
- 13.- Pseudomonas putida FVB 3014
- 14.- Pseudomonas maltophilia FVB 3112
- 15.- Yersinia enterocolitica FVB 3245
- 16.- Hafnia alvei ATCC 13337
- 17.- Enterobacter aerogenes FVB 5678
- 18.- Enterobacter cloacae FVB 6789
- 19.- Morganella morganii ATCC 25830
- 20.- Morganella morganii FVB 2490
- 21.- Proteus mirabilis FVB 6745
- 22.- Proteus vulgaris ATCC 9484
- 23.- Providencia rettgeri ATCC 29944
- 24.- Serratia marcescens ATCC 8412
- 25.- Klebsiella pneumoniae ATCC 1388
- 26.- Shigella sonnei ATCC 413

- 27.- Penicillium corylophilum FVB 413
- 28.- Aspergillus niger FVB 404
- 29.- Aspergillus flavus FVB 410
- 30.- Aspergillus fumigatus FVB 413
- 31.- Cladosporium herbarum FVB 675
- 32.- Alternaria longipes FVB 876
- 33.- Candida albicans CECT 1001
- 34.- Saccharomyces cerevisiae FVB 2004

3.2.2. Optimización de la producción de metabolitos activos a través de procesos en fermentador de bajo volumen.

La optimización del proceso de obtención de los metabolitos activos se llevó a cabo en un fermentador de 2 litros de capacidad de la firma LH. La unidad está provista de controles de aireación, agitación, temperatura, antiespumante y pH.

La solución de antiespumante se adicionaba controladamente a la vasiija del bioreactor. El antiespumante elegido cuya inocuidad frente al desarrollo de las cepas fúngicas en estudio se demostró previamente era la emulsión Antifoam B, Sigma Chemical Co..

Se analizaba asimismo la cantidad de oxígeno disuelto presente en el cultivo con el fin de asegurar el nivel crítico de oxígeno de forma constante.

Los cultivos del género Arthrrium en estudio se mantenían en agar extracto de malta al 2%. Las células fúngicas eran recogidas en suspensión en 6 ml en suero fisiológico previamente esterilizado. A partir de la suspensión se procedió a inocular el medio de cultivo del bioreactor.

El medio de cultivo utilizado en el bioreactor fue de base, extracto de malta al 2%, si bien se ensayó la influencia de la concentración de glucosa (20 g/l o 10 g/l) en el crecimiento y en la producción de metabolitos secundarios activos. Otro parámetro considerado fue la presencia o ausencia de luz.

Las condiciones experimentales de trabajo del bioreactor fueron: flujo de aire, 0.6 vvm, agitación, 650 rpm, temperatura 28°C, pH controlado automáticamente a 6, mediante la adición de OHNa 5N o de H₂SO₄ 5N, en caso de ser necesario.

Mediante los estudios en bioreactor se han analizado los siguientes parámetros:

- a.- Porcentaje de glucosa consumida.
- b.- Coeficiente de economía del proceso
- c.- Coeficiente específico de crecimiento (μ).

- a.- Porcentaje de glucosa consumida.

La glucosa residual se valoró mediante reactivo de Fehling a partir del extracto líquido filtrado. Establecido el valor de glucosa residual (G_r) expresado en g/l y siguiendo los criterios citados por Demain y Solomon, 1986, se aplica la fórmula siguiente para conocer el porcentaje de glucosa consumida:

$$\% \text{ Glucosa consumida} = \frac{G_o - G_r}{G_o} \times 100$$

- b.- Coeficiente de economía del proceso.

Este parámetro permite evaluar, la eficiencia del consumo de la fuente de carbono suministrada (Demain y Solomon, 1986). Se determina aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso seco del cultivo (micelio + conidios)}}{\text{Peso del carbohidrato consumido}} \times 100$$

c.- Coeficiente específico de crecimiento.

La ecuación siguiente permite expresar este parámetro (Demain y Solomon, 1986).

$$N = N_0 \times e^{\mu t}$$

N_0 = Biomasa inicial.

N = Biomasa entre t_0 y t

μ = Coeficiente específico de crecimiento

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

En este apartado aportamos la formulación cualitativa y cuantitativa de los medios de cultivo generales utilizados a lo largo de la realización de este estudio, dado que los medios más específicos se han ido indicando en los apartados anteriores.

Caldo extracto de malta al 2%

Extracto de malta	20 g
Glucosa	20 g
Peptona	1 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

pH 4.5 \pm 0.5

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Agar extracto de malta al 2%

Caldo extracto de malta al 2%	1 l
Agar-agar	20 g

pH 4.5 \pm 0.5

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Agar Tripticasa Soja

Digerido pancreático de caseína	17.0 g
Digerido papaínico de harina de soja.	3.0 g
Cloruro sódico	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Glucosa	2.5 g
Agua destilada	c.s.p. 1.0 l

Se distribuye a razón de 9 ml por tubo de ensayo y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Medio de crecimiento para Artemia salina

Este medio se denomina BSM y su composición se resume a continuación

Glicerofosfato cálcico	3.0 g
Cloruro sódico	30.0 g
Sulfato magnésico heptahidrato	0.5 g
Cloruro magnésico hexahidrato	1.5 g
Cloruro potásico	0.8 g
Cloruro cálcico dihidrato	0.3 g
Bromuro magnésico hexahidrato	0.1 g
Glicina	6.0 g
Agua destilada	c.s.p. 1.0 l

pH 6.5 ± 0.1

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.

4.1.1. Resultados obtenidos en la detección de la actividad inhibidora del extracto crudo frente a bacterias y levaduras.

Los resultados obtenidos al detectar la actividad inhibidora del extracto crudo frente a bacterias y levaduras se expresan en la Tabla núm. 3 como porcentaje de lisis del microorganismo al cual se enfrentan los extractos crudos. El porcentaje de lisis se obtuvo aplicando la fórmula de Candeli, descrita en el apartado de Material y Métodos. Si el extracto añadido determinaba un incremento en el desarrollo de los microorganismos se indica mediante guiones.

Los microorganismos ensayados en este apartado han sido elegidos o por presentar una mayor sensibilidad en los estudios precedentes o bien por su mayor interés como agentes etiológicos de procesos en el hombre y en los animales.

Estos microorganismos son:

- 1: Bacillus cereus
 - 2: Staphylococcus aureus
 - 3: Escherichia coli
 - 4: Streptococcus faecalis
 - 5: Enterobacter cloacae
 - 6: Pseudomonas aeruginosa
 - 7: Candida albicans
-

BACTERIAS Y LEVADURAS

CEPA	1	2	3	4	5	6	7
A1	----	42.56	----	8.83	44.57	10.94	70.04
A2	11.01	45.86	----	12.69	49.42	10.66	67.28
A3	25.42	41.20	----	10.55	36.57	6.09	58.06
A4	----	----	----	4.97	43.42	1.80	3.68
A5	----	----	----	----	----	25.43	----
A6	----	10.44	----	21.47	100.00	----	----
A7	19.81	----	----	2.32	----	92.45	----
A8	----	29.93	----	10.86	6.71	4.43	76.95
A9	----	----	12.09	10.51	----	----	4.49
A10	----	30.55	14.49	----	----	----	19.42
A11	3.15	----	----	----	----	85.96	----
A12	----	11.94	----	----	----	----	28.93
A13	0.00	65.27	4.91	6.45	90.58	0.00	47.23
A14	----	13.89	----	----	----	4.84	----
A15	34.68	----	----	----	----	90.72	----
A16	----	14.92	----	----	----	3.73	73.58
A17	----	----	2.62	----	----	----	----
A18	----	11.11	9.34	3.22	----	6.61	64.82
A19	10.36	----	----	----	----	89.72	----
A20	----	----	----	0.00	----	2.48	----
A21	----	----	3.24	0.00	93.90	----	4.40
A22	0.00	19.40	----	12.79	----	----	0.00

Tabla núm. 3.- Resultados obtenidos en la detección de la actividad inhibidora del extracto crudo frente a bacterias y levaduras (% lisis).

CEPA	BACTERIAS Y LEVADURAS						
	1	2	3	4	5	6	7
A23	100.00	65.99	----	6.31	60.98	0.00	100.00
A24	100.00	37.02	----	----	48.90	----	6.72
A25	91.24	84.54	----	14.41	82.57	10.66	58.98
A26	----	61.11	3.71	11.58	----	1.93	12.47
A27	3.15	----	----	----	----	93.11	----
A28	----	----	1.79	9.55	68.23	0.00	20.24
A29	0.00	13.88	77.96	2.74	100.00	5.64	6.33
A30	----	----	----	13.40	36.28	0.00	----
A31	----	----	13.05	14.69	62.35	----	0.00
A32	----	----	11.49	13.73	43.52	----	32.10
A33	----	----	----	16.48	----	----	3.14
A34	22.97	----	----	----	----	85.16	----
A35	----	52.08	----	19.69	----	----	0.00
A36	27.68	18.07	----	9.34	----	11.77	71.42
A37	18.91	----	----	----	----	92.84	----
A38	----	----	4.17	10.62	----	1.45	----
A39	----	----	----	----	52.49	----	9.61
A40	41.44	13.79	13.79	0.00	31.42	94.43	74.19
A41	62.60	23.67	----	----	0.00	----	----
A42	----	0.00	----	10.65	----	10.24	31.56
A43	----	29.44	----	8.02	4.85	9.27	72.58
A44	----	----	----	6.33	----	----	30.47
A45	100.00	30.98	----	7.33	100.00	----	29.41
A46	----	----	----	----	----	89.80	----

Tabla núm. 3.- (continuación).

BACTERIAS Y LEVADURAS

CEPA	1	2	3	4	5	6	7
A1	> 2	1.7	1.5	1.7	1.7	1.7	1.3
A2	1.3	1.7	1.5	1.7	1.7	1.7	1.3
A3	1.3	1.5	1.5	1.7	1.7	1.7	1.3
A4	> 2	> 2	1.5	1.7	1.5	1.7	1.3
A5	1.3	> 2	> 2	> 2	> 2	1.7	1.3
A6	> 2	2.0	2.0	1.7	1.7	2.0	> 2
A7	1.3	1.7	1.7	1.7	1.5	1.5	1.5
A8	1.5	1.7	2.0	1.7	1.7	1.7	1.3
A9	> 2	1.5	1.7	1.7	1.7	2.0	1.3
A10	> 2	1.7	1.7	> 2	1.5	> 2	1.3
A11	1.3	1.7	1.7	1.7	1.5	1.5	1.5
A12	1.3	1.7	> 2	> 2	> 2	2.0	> 2
A13	> 2	1.7	1.5	1.7	1.3	> 2	0.3
A14	1.7	1.7	1.5	> 2	> 2	1.7	1.5
A15	1.3	> 2	1.5	> 2	1.5	1.3	1.7
A16	> 2	1.7	> 2	> 2	1.7	1.7	1.3
A17	1.3	> 2	1.7	> 2	1.7	2.0	> 2
A18	> 2	1.7	1.7	1.7	1.7	2.0	1.3
A19	1.3	> 2	1.5	> 2	1.5	1.5	1.3
A20	> 2	2.0	> 2	> 2	1.7	1.7	1.3
A21	> 2	> 2	1.7	1.7	1.0	> 2	1.3
A22	> 2	> 2	2.0	1.7	> 2	2.0	1.3

Tabla núm. 4.- Resultados obtenidos en la determinación del volumen mínimo del extracto crudo que inhibe el crecimiento de bacterias y levaduras.

CEPA	BACTERIAS Y LEVADURAS						
	1	2	3	4	5	6	7
A23	0.7	1.5	> 2	1.7	1.5	2.0	1.0
A24	0.7	1.7	2.0	> 2	1.5	2.0	1.3
A25	1.3	1.3	1.5	1.7	1.5	1.7	1.3
A26	> 2	1.5	1.7	1.7	1.7	> 2	1.3
A27	1.3	2.0	1.7	> 2	1.5	1.5	> 2
A28	> 2	1.5	1.7	1.7	1.3	2.0	1.3
A29	1.5	1.3	1.5	1.7	0.7	1.5	1.3
A30	1.3	1.3	1.7	1.7	1.7	2.0	1.3
A31	> 2	2.0	1.7	1.7	1.5	2.0	1.3
A32	1.3	2.0	1.5	1.7	1.7	2.0	> 2
A33	> 2	1.7	> 2	1.5	> 2	2.0	> 2
A34	1.3	> 2	1.5	> 2	1.7	1.7	1.3
A35	> 2	1.7	1.5	1.7	> 2	1.7	1.7
A36	1.3	1.7	1.7	1.7	> 2	1.7	1.3
A37	> 2	1.7	2.0	> 2	> 2	0.7	> 2
A38	> 2	1.7	1.7	1.7	> 2	1.7	> 2
A39	> 2	> 2	1.7	> 2	1.5	> 2	1.0
A40	1.3	1.7	1.3	> 2	1.5	1.5	1.3
A41	1.3	1.7	> 2	> 2	1.7	> 2	1.3
A42	> 2	> 2	1.5	1.7	> 2	1.7	1.5
A43	> 2	1.5	2.0	1.7	1.7	1.7	1.3
A44	1.5	> 2	1.5	1.7	> 2	2.0	1.3
A45	0.7	1.7	> 2	1.7	0.7	> 2	1.3
A46	> 2	1.7	1.5	> 2	1.5	1.5	> 2

Tabla núm. 4.- (continuación).

- 4.1.3. Resultados correspondientes a la detección de la actividad inhibidora de los extractos crudos sobre la germinación de los hongos filamentosos.

La posible capacidad de inhibir la germinación de los hongos filamentosos por parte de los extractos obtenidos fue estudiada a lo largo de 24 y 48 horas.

Los hongos filamentosos a los cuales se enfrentó el extracto crudo de cada una de las cepas del género Arthrinium en estudio fueron:

Penicillium corvulophilum

Aspergillus niger

Aspergillus flavus

Aspergillus fumigatus

Los resultados obtenidos en la detección de la actividad inhibidora de los extractos crudos se detallan en la Tablas siguientes, en las cuales se expresa el porcentaje de inhibición de la germinación observado al comparar con un ensayo control y aplicando la fórmula de Candeli.

Asimismo, se destaca en las Tablas la formación de micelio y la presencia de cabezas conidiales comparando siempre con el ensayo control.

Las Tablas números 5 y 6 detallan los resultados correspondientes a la actividad frente a Penicillium corvulophilum a las 24 y 48h de iniciado el ensayo.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A1	44.44	+	-
A2	0.00	+	-
A3	20.00	+	-
A4	20.00	+	-
A5	88.88	+	-
A6	44.44	+	-
A7	0.00	+	-
A8	44.44	+	-
A9	0.00	-	-
A10	30.00	+	-
A11	88.88	+	-
A12	66.66	+	-
A13	30.00	-	-
A14	100.00	+	+
A15	66.66	+	-
A16	0.00	-	-
A17	40.00	-	-
A18	10.00	-	-
A19	22.22	+	-
A20	0.00	-	-
A21	0.00	-	-
A22	20.00	-	-

Tabla núm. 5.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad inhibidora de los extractos crudos sobre Penicillium corylophilum a las 24h de iniciado el ensayo.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A23	10.00	+	-
A24	50.00	+	-
A25	72.00	+	-
A26	10.00	-	-
A27	0.00	-	-
A28	30.00	-	-
A29	0.00	-	-
A30	0.00	+	-
A31	20.00	-	-
A32	0.00	-	-
A33	11.11	+	-
A34	88.88	+	-
A35	88.88	-	-
A36	55.55	+	-
A37	11.11	-	-
A38	0.00	-	-
A39	40.00	+	-
A40	77.77	+	-
A41	80.00	+	-
A42	77.77	+	-
A43	0.00	+	-
A44	0.00	-	-
A45	70.00	+	-
A46	11.11	+	-

Tabla núm. 5.- (continuación).

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A1	0.00	+	-
A2	0.00	-	+
A3	0.00	-	+
A4	30.00	+	+
A5	0.00	-	-
A6	0.00	-	-
A7	0.00	-	-
A8	0.00	+	+
A9	0.00	-	-
A10	100.00	+	+
A11	0.00	-	-
A12	20.00	-	+
A13	0.00	-	+
A14	0.00	-	-
A15	0.00	-	-
A16	0.00	-	-
A17	0.00	-	-
A18	0.00	-	+
A19	0.00	-	-
A20	0.00	-	-
A21	0.00	-	-
A22	0.00	-	-

Tabla núm. 6.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad inhibidora de los extractos crudos sobre Penicillium corylophilum a las 48h de iniciado el ensayo.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A23	0.00	-	-
A24	0.00	-	-
A25	0.00	+	-
A26	0.00	-	-
A27	0.00	+	-
A28	0.00	-	-
A29	40.00	+	+
A30	0.00	+	-
A31	0.00	+	+
A32	0.00	+	+
A33	0.00	-	-
A34	0.00	+	+
A35	0.00	+	+
A36	80.00	+	+
A37	0.00	-	-
A38	0.00	-	-
A39	0.00	-	-
A40	0.00	-	-
A41	0.00	-	-
A42	0.00	-	+
A43	0.00	-	-
A44	0.00	-	+
A45	0.00	-	-
A46	0.00	-	-

Tabla núm. 5.- (continuación).

En las Tablas números 7 y 8 se expresan los resultados correspondientes a Aspergillus niger.

Las Tablas números 9 y 10 son las relativas a los resultados frente a Aspergillus flavus.

Finalmente, las Tablas números 11 y 12 corresponden a los resultados observados en Aspergillus fumigatus.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A1	-	-	-
A2	100.00	+	+
A3	0.00	+	-
A4	-	+	-
A5	0.00	-	-
A6	0.00	-	-
A7	0.00	-	-
A8	-	-	-
A9	-	-	-
A10	50.00	+	-
A11	0.00	-	-
A12	0.00	-	-
A13	-	-	-
A14	0.00	-	-
A15	0.00	-	-
A16	-	+	-
A17	-	-	-
A18	100.00	-	-
A19	0.00	-	-
A20	16.66	-	-
A21	100.00	-	-
A22	-	-	-

Tabla núm. 7.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad inhibidora de los extractos crudos sobre Aspergillus niger a las 24h de iniciado el ensayo.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A23	-	-	-
A24	100.00	+	+
A25	-	-	-
A26	-	-	-
A27	-	-	-
A28	100.00	-	-
A29	-	-	-
A30	0.00	+	-
A31	0.00	+	-
A32	-	-	-
A33	0.00	-	-
A34	0.00	-	-
A35	0.00	-	-
A36	-	-	-
A37	0.00	-	-
A38	-	-	-
A39	0.00	+	-
A40	0.00	-	-
A41	-	-	-
A42	0.00	-	-
A43	-	+	-
A44	-	-	-
A45	0.00	-	-
A46	0.00	-	-

Tabla núm. 7.- (continuación).

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A1	0.00	+	-
A2	0.00	-	-
A3	0.00	-	-
A4	20.00	+	-
A5	-	-	+
A6	-	-	+
A7	-	-	+
A8	0.00	+	-
A9	0.00	-	+
A10	100.00	+	+
A11	-	-	+
A12	-	-	+
A13	0.00	-	+
A14	-	-	-
A15	-	-	+
A16	25.00	-	-
A17	0.00	-	-
A18	0.00	-	+
A19	-	-	+
A20	0.00	-	-
A21	0.00	-	+
A22	0.00	-	-

Tabla núm. 8.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad inhibidora de los extractos crudos sobre Aspergillus niger a las 48h de iniciado el ensayo.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A23	25.00	-	-
A24	42.50	-	-
A25	0.00	+	+
A26	0.00	-	+
A27	0.00	+	+
A28	0.00	-	+
A29	0.00	-	+
A30	0.00	+	-
A31	0.00	+	-
A32	0.00	+	-
A33	0.00	-	+
A34	-	-	+
A35	0.00	-	-
A36	0.00	-	-
A37	-	-	+
A38	0.00	-	-
A39	0.00	-	+
A40	-	-	+
A41	25.50	-	-
A42	0.00	-	+
A43	0.00	-	-
A44	0.00	-	+
A45	0.00	-	-
A46	-	-	+

Tabla núm. 8.- (continuación).

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A1	83.33	-	-
A2	71.42	+	+
A3	71.42	+	+
A4	46.66	+	-
A5	0.00	-	-
A6	0.00	-	-
A7	0.00	-	-
A8	-	-	-
A9	100.00	+	-
A10	100.00	+	+
A11	0.00	-	-
A12	0.00	-	-
A13	100.00	+	-
A14	0.00	-	-
A15	0.00	-	-
A16	100.00	+	-
A17	100.00	+	-
A18	83.33	+	+
A19	0.00	-	-
A20	100.00	-	-
A21	0.00	-	-
A22	100.00	+	-

Tabla núm. 9.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad inhibidora de los extractos crudos sobre Aspergillus flavus a las 24h de iniciado el ensayo.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A23	41.66	+	+
A24	50.00	+	+
A25	100.00	+	+
A26	100.00	+	-
A27	60.00	-	-
A28	80.00	-	-
A29	100.00	+	-
A30	100.00	+	+
A31	100.00	+	+
A32	83.33	+	+
A33	0.00	-	-
A34	0.00	-	-
A35	-	-	-
A36	100.00	-	-
A37	0.00	-	-
A38	100.00	+	-
A39	0.00	+	+
A40	0.00	-	-
A41	100.00	+	+
A42	0.00	-	-
A43	100.00	+	+
A44	0.00	-	-
A45	71.42	+	+
A46	0.00	-	-

Tabla núm. 9.- (continuación).

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A1	0.00	+	-
A2	0.00	-	+
A3	0.00	-	+
A4	0.00	-	-
A5	67.50	+	+
A6	0.00	-	-
A7	0.00	+	+
A8	0.00	-	-
A9	100.00	+	+
A10	0.00	+	+
A11	0.00	+	+
A12	96.25	+	+
A13	0.00	-	+
A14	75.00	+	+
A15	50.00	+	+
A16	0.00	-	-
A17	0.00	-	-
A18	0.00	-	+
A19	75.00	+	-
A20	0.00	+	-
A21	75.00	+	+
A22	0.00	-	-

Tabla núm. 10.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad inhibidora de los extractos crudos sobre Aspergillus flavus a las 48h de iniciado el ensayo.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A23	0.00	+	+
A24	0.00	+	+
A25	0.00	+	+
A26	10.00	-	+
A27	0.00	+	+
A28	50.00	-	+
A29	0.00	-	+
A30	50.00	+	-
A31	100.00	+	+
A32	100.00	+	+
A33	91.25	+	+
A34	62.50	+	+
A35	0.00	-	-
A36	0.00	+	-
A37	0.00	+	-
A38	0.00	-	-
A39	30.00	-	+
A40	87.50	+	+
A41	0.00	+	+
A42	87.50	+	+
A43	0.00	-	-
A44	0.00	-	-
A45	0.00	+	+
A46	0.00	+	+

Tabla núm. 10.- (continuación).

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A1	0.00	-	-
A2	100.00	+	+
A3	100.00	+	+
A4	100.00	+	-
A5	0.00	-	-
A6	0.00	-	-
A7	0.00	-	-
A8	0.00	-	-
A9	0.00	+	-
A10	100.00	+	+
A11	0.00	-	-
A12	0.00	-	-
A13	0.00	+	-
A14	0.00	-	-
A15	0.00	-	-
A16	0.00	+	-
A17	0.00	+	-
A18	100.00	+	+
A19	0.00	-	-
A20	0.00	+	-
A21	0.00	-	-
A22	0.00	+	-

Tabla núm. 11.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad inhibidora de los extractos crudos sobre Aspergillus fumigatus a las 24h de iniciado el ensayo.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A23	100.00	+	+
A24	100.00	+	+
A25	100.00	+	+
A26	0.00	+	-
A27	0.00	+	-
A28	0.00	+	-
A29	0.00	+	+
A30	100.00	+	+
A31	100.00	+	+
A32	0.00	+	-
A33	0.00	-	-
A34	0.00	-	-
A35	0.00	-	-
A36	0.00	-	-
A37	0.00	-	-
A38	0.00	+	-
A39	100.00	+	+
A40	0.00	-	-
A41	100.00	+	+
A42	0.00	-	-
A43	100.00	+	-
A44	0.00	+	-
A45	100.00	+	+
A46	0.00	-	-

Tabla núm. 11.- (continuación).

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A1	0.00	+	-
A2	0.00	+	-
A3	100.00	-	+
A4	0.00	-	-
A5	96.00	+	+
A6	100.00	+	+
A7	100.00	+	+
A8	100.00	+	+
A9	100.00	+	+
A10	100.00	+	+
A11	96.00	+	+
A12	100.00	+	-
A13	100.00	-	+
A14	100.00	+	+
A15	100.00	+	+
A16	62.50	+	-
A17	100.00	+	-
A18	90.00	+	+
A19	96.00	+	+
A20	100.00	+	-
A21	100.00	+	+
A22	100.00	+	-

Tabla núm. 12.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad inhibidora de los extractos crudos sobre Aspergillus fumigatus a las 48h de iniciado el ensayo.

CEPA	Inhibición germinación (%)	Inhibición micelio	Inhibición cadenas conidiales
A23	40.00	-	-
A24	0.00	-	-
A25	38.66	+	+
A26	100.00	+	+
A27	97.00	+	+
A28	100.00	+	+
A29	40.00	-	-
A30	100.00	+	+
A31	98.00	+	+
A32	100.00	+	+
A33	100.00	+	+
A34	80.00	+	+
A35	60.00	+	-
A36	0.00	+	+
A37	60.00	+	+
A38	12.50	-	-
A39	100.00	+	+
A40	100.00	+	+
A41	40.00	-	-
A42	0.00	-	-
A43	0.00	+	+
A44	98.00	+	+
A45	40.00	+	-
A46	100.00	+	+

Tabla núm. 12.- (continuación).

4.1.4. Resultados obtenidos en la detección de la actividad letal de los extractos frente a larvas de Artemia salina.

Se detectó la actividad letal sobre larvas de Artemia salina adicionando, 0.1 o 0.2 ml del extracto crudo.

De cada uno de los ensayos se realizaron cuatro lecturas que correspondieron a diferentes tiempos de contacto entre las larvas y los extractos correspondientes.

Las lecturas se llevaron a cabo a las:

4h 30'

7h 30'

9h 30'

24h 00'

Los resultados se expresan como porcentaje de letalidad de larvas de Artemia salina y se detallan en las Tablas números 13 y 14.

CEPA	4h 30'		7h 30'	
	0.1ml E.C.	0.2ml E.C.	0.1ml E.C.	0.2ml E.C.
A1	0	0	0	0
A2	0	0	0	0
A3	0	0	0	0
A4	0	0	0	100
A5	0	0	0	0
A6	0	0	0	0
A7	0	0	0	0
A8	0	0	0	0
A9	0	22	0	22
A10	0	0	0	0
A11	0	0	0	0
A12	0	0	0	0
A13	0	0	0	0
A14	0	0	0	0
A15	0	0	0	0
A16	0	0	0	0
A17	2	90	2	100
A18	0	0	0	0
A19	0	0	0	0
A20	0	0	0	0
A21	0	10	0	10
A22	0	100	0	100

Tabla núm. 13.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad letal de los extractos crudos (E.C.) frente a larvas de Artemia salina (% de letalidad).

CEPA	4h 30'		7h 30'	
	0.1ml E.C.	0.2ml E.C.	0.1ml E.C.	0.2ml E.C.
A23	0	0	0	0
A24	0	0	0	20
A25	0	0	0	0
A26	0	0	0	0
A27	0	0	0	0
A28	30	30	30	30
A29	0	0	0	0
A30	0	0	0	100
A31	0	0	0	0
A32	0	0	0	0
A33	0	0	0	0
A34	0	0	0	0
A35	0	0	0	20
A36	0	0	0	50
A37	0	0	0	0
A38	0	0	0	0
A39	0	0	0	0
A40	0	0	0	0
A41	0	0	0	0
A42	0	0	0	0
A43	0	0	0	0
A44	0	0	0	0
A45	0	0	0	0
A46	0	17	0	17

Tabla núm. 13.- (continuación).

CEPA	9h 30'		24h	
	0.1ml E.C.	0.2ml E.C.	0.1ml E.C.	0.2ml E.C.
A1	0	20	20	40
A2	0	0	90	100
A3	0	0	100	100
A4	0	100	0	100
A5	0	0	30	100
A6	0	0	50	100
A7	0	0	0	0
A8	30	40	50	100
A9	0	100	0	100
A10	0	0	0	50
A11	0	0	10	100
A12	0	0	100	100
A13	0	80	20	100
A14	0	0	100	100
A15	0	100	50	100
A16	0	17	100	100
A17	100	100	100	100
A18	0	100	0	100
A19	0	0	100	100
A20	0	80	100	100
A21	9	21	50	100
A22	30	100	100	100

Tabla núm. 14.- Resultados correspondientes a la detección de la capacidad letal de los extractos crudos (E.C.) frente a larvas de Artemia salina (% de letalidad).

CEPA	9h 30'		24h	
	0.1ml E.C.	0.2ml E.C.	0.1ml E.C.	0.2ml E.C.
A23	0	0	50	100
A24	10	30	100	100
A25	0	0	0	0
A26	0	36	100	100
A27	80	100	80	100
A28	50	100	80	100
A29	0	100	100	100
A30	0	100	100	100
A31	0	0	100	100
A32	16	50	50	50
A33	100	100	100	100
A34	0	0	0	100
A35	20	20	20	30
A36	0	60	20	90
A37	0	80	60	90
A38	19	100	50	100
A39	0	0	10	100
A40	0	0	50	100
A41	0	0	10	90
A42	0	15	50	100
A43	100	100	100	100
A44	0	20	100	100
A45	0	0	50	100
A46	0	50	0	100

Tabla núm. 14.- (continuación).

4.1.5. Resultados obtenidos en el estudio bajo microscopio electrónico de barrido.

En este estudio se observaron las posible modificaciones que los extractos obtenidos pudieran manifestar sobre la morfología de los microorganismos.

Se eligieron los extractos crudos de cepas de Arthrinium de notable actividad antimicrobiana y se ensayaron sobre Escherichia coli y sobre Enterobacter cloacae.

Un ejemplo de los resultados obtenidos se pueden observar en las Fotografías siguientes.

En la Lámina número 1 se aprecian algunas modificaciones morfológicas observadas en Escherichia coli, destacando las alteraciones de la superficie externa del microorganismo, indicada con flechas sobre la Fotografía.

La Lámina núm. 2 corresponde a las alteraciones observadas en la morfología de Enterobacter cloacae, se detecta una disminución del tamaño y asimismo una marcada disminución del número de microorganismos por campo de microscopio evaluado.

En ambos casos la morfología normal de los microorganismos puede observarse en el ensayo control.



C

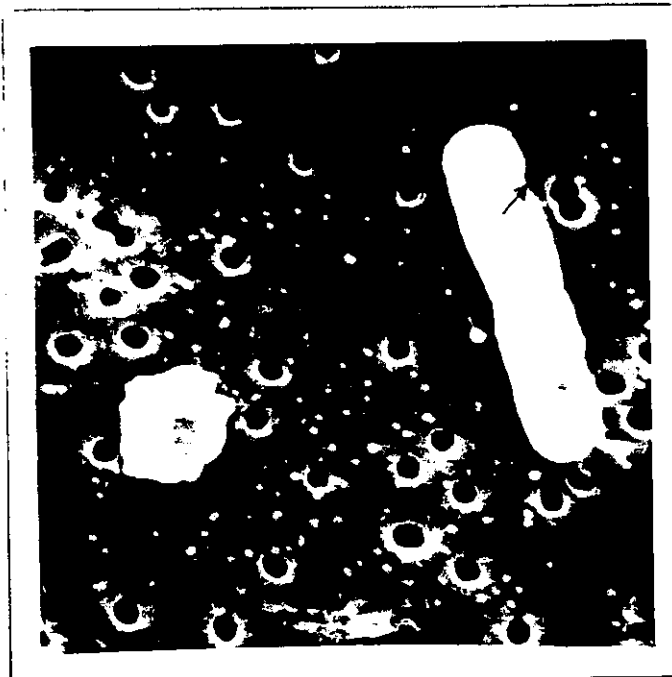


Lámina num. 1.- Alteraciones morfológicas detectadas en Escherichia coli por acción de los extractos de ant-thrinium, respecto al ensayo control (C).



Lámina núm. 2.- Alteraciones observadas en la morfología y cuantificación de Enterobacter cloacae por acción de los extractos de Arthrinium, comparando con el control (C).

4.1.6. Resultados obtenidos para la detección del punto óptimo de producción de sustancias antibióticas en relación con el crecimiento del microorganismo en estudio.

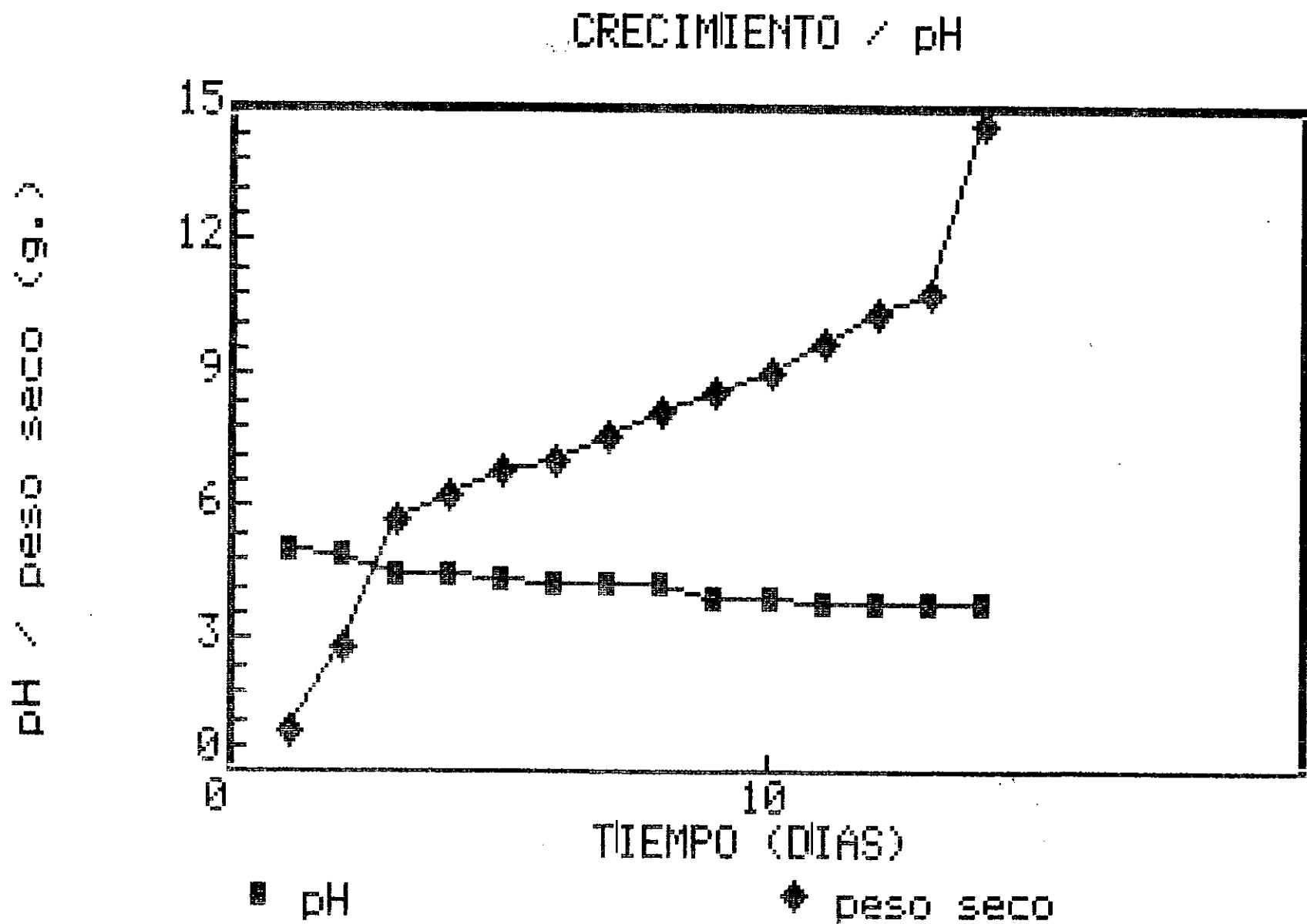
En la Gráfica número 1 se representa la curva de crecimiento en relación al pH del medio de cultivo de las cepas del género Arthriniun durante catorce días de incubación a 28°C y a 190 rpm.

Los valores utilizados para la elaboración de las Gráficas corresponden a los valores medios determinados para todas las cepas del género en estudio.

Los valores correspondientes a las variaciones del pH y del peso seco son las que se indican a continuación:

Día de incubación	pH	peso seco (g)
1	5.08	0.93
2	4.99	2.85
3	4.53	5.67
4	4.47	6.30
5	4.39	6.83
6	4.28	7.08
7	4.26	7.59
8	4.24	8.14
9	3.90	8.61
10	3.89	9.07
11	3.88	9.72
12	3.88	10.37
13	3.88	10.85
14	3.88	14.63

GRAFICA número 1.- Curva de crecimiento en relación al pH del medio de cultivo.



En la Tabla número 15 se expresan los resultados correspondientes a las diferentes actividades antibióticas de los extractos crudos totales y separadamente de las fases orgánicas procedentes del cultivo de las cepas en estudio a lo largo de catorce días de incubación a 190 rpm a lo largo de catorce días y a 28°C sobre los diferentes microorganismos ensayados.

Para la realización de esta prueba se eligieron las cepas del género Arthrinium que mostraron mayor grado de actividad en estudios anteriores y los resultados corresponden a una valoración global de las actividades detectadas a nivel de género.

La fracción acuosa del extracto no presentó actividad alguna sobre ninguno de los microorganismos ensayados.

Para una mejor interpretación de la Tabla debemos considerar que las letras representan a:

A = Staphylococcus aureus

B = Bacillus cereus

C = Streptococcus faecalis

D = Pseudomonas aeruginosa

E = Escherichia coli

F = Candida albicans

G = Aspergillus niger

TIEMPO DE
INCUBACION
(dias)

M I C R O O R G A N I S M O S

	A	B	C	D	E	F	G
1	O	-	-	T O	-	-	-
2	O	-	O	T O	O	-	-
3	O	-	O	T O	O	-	-
4	O	-	O	T O	O	-	-
5	O	-	O	T O	O	-	-
6	O	O	O	T O	O	O	-
7	O	O	O	T O	O	O	-
8	O	O	O	T O	O	O	O
9	O	O	O	T O	O	O	O
10	O	O	O	T O	O	O	-
11	O	O	O	T O	O	O	-
12	O	O	O	T O	O	O	-
13	O	O	O	T O	O	O	-
14	O	O	O	T O	O	O	-

Tabla núm 15 .- Actividad del extracto crudo total y de la fase orgánica sobre microorganismos.

T = Sensibilidad del microorganismo frente al extracto crudo total.
O = Sensibilidad del microorganismo frente a la fase orgánica.
- = No se detecta sensibilidad del microorganismo.

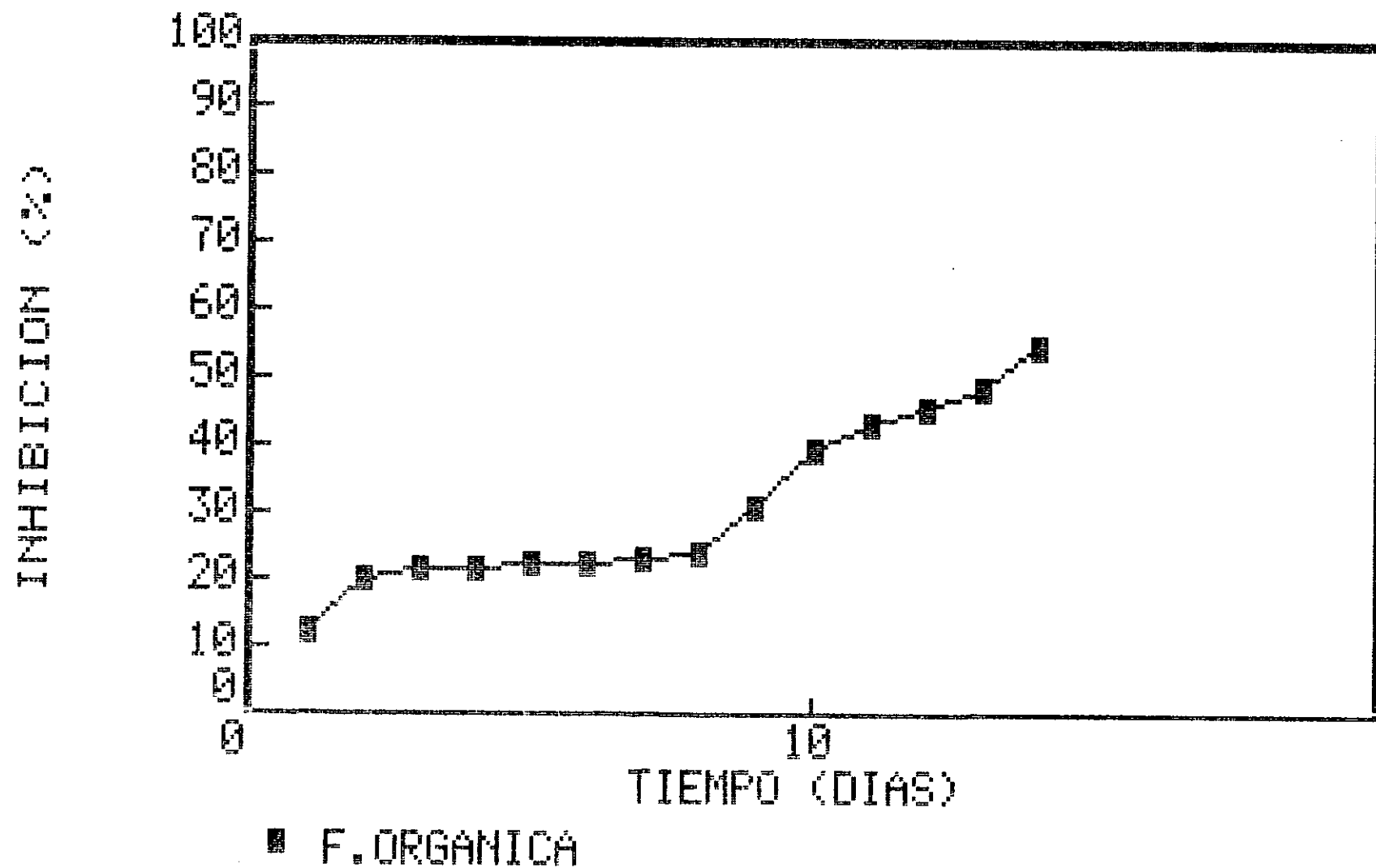
En la Gráfica número 2 se esquematizan los porcentajes de inhibición del desarrollo de Staphylococcus aureus debidos a la acción de las fases orgánicas del medio de cultivo en el que se desarrollaron las cepas del género Arthriniun a lo largo de catorce días en las condiciones indicadas en el apartado de Material y Métodos.

Los extractos crudos totales y las fases acuosas no presentaron actividad antibiótica sobre este microorganismo.

Los valores de inhibición observados son los siguientes:

Días de desarrollo del cultivo del que procede el extracto	Porcentaje de inhibición
1	12.6
2	20.7
3	21.9
4	22.2
5	22.4
6	22.5
7	23.4
8	24.6
9	30.9
10	39.9
11	43.4
12	45.7
13	48.9
14	55.2

STAPHYLOCOCCUS AUREUS



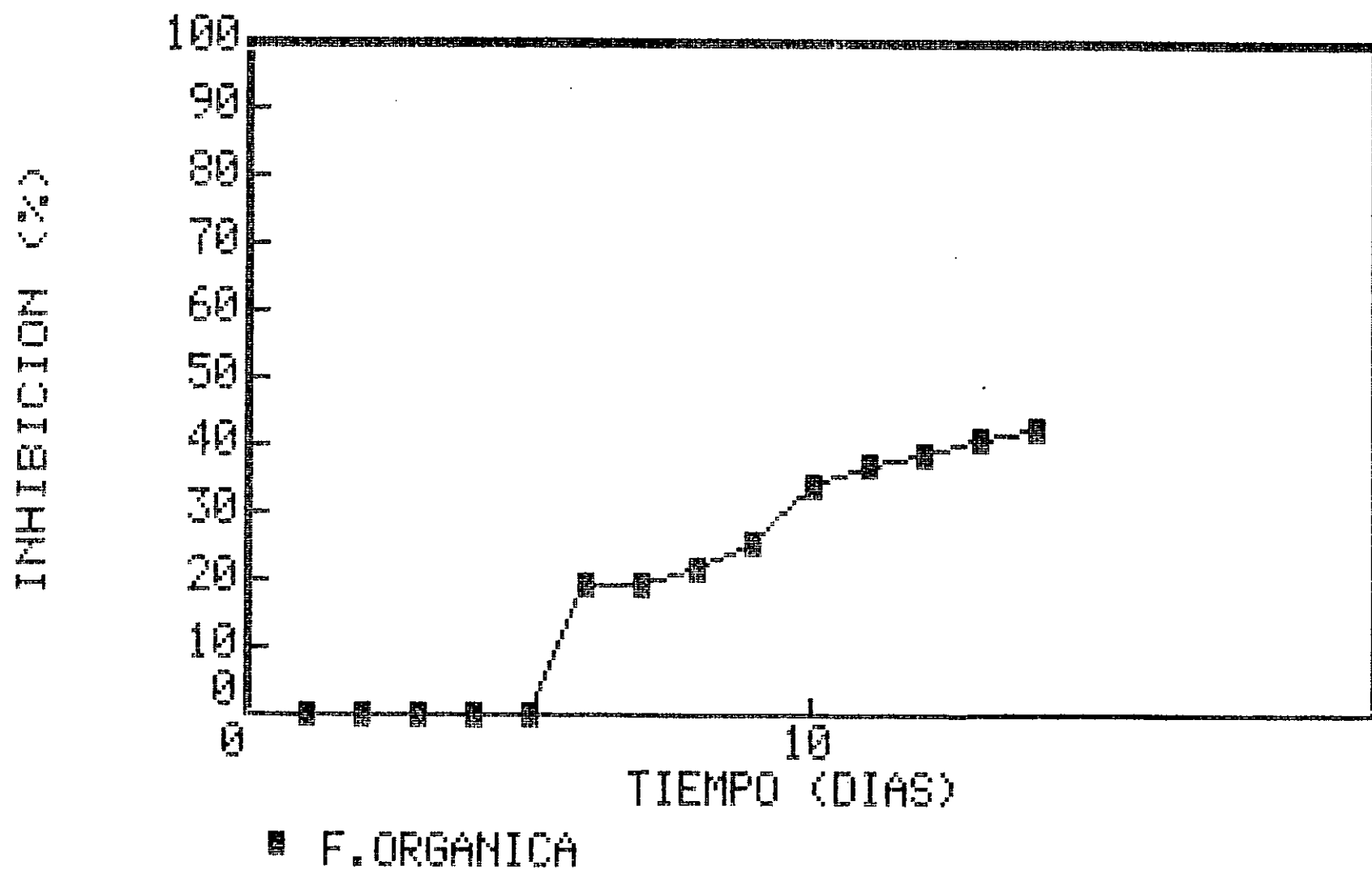
En la Gráfica número 3 se esquematizan los porcentajes de inhibición del desarrollo de Bacillus cereus debidos a la acción de las fases orgánicas del medio de cultivo en el que se desarrollaron las cepas del género Arthriniun a lo largo de catorce días en las condiciones indicadas en el apartado de Material y Métodos.

Los extractos crudos totales y las fases acuosas no presentaron actividad antibiótica sobre este microorganismo.

Los valores de inhibición observados son los siguientes:

Días de desarrollo del cultivo del que procede el extracto	Porcentaje de inhibición
1	0.0
2	0.0
3	0.0
4	0.0
5	0.0
6	19.3
7	19.6
8	22.3
9	25.4
10	34.1
11	37.3
12	39.2
13	41.4
14	42.9

BACILLUS CEREUS



En la Gráfica número 4 se esquematizan los porcentajes de inhibición del desarrollo de Streptococcus faecalis debidos a la acción de las fases orgánicas del medio de cultivo en el que se desarrollaron las cepas del género Arthriniun a lo largo de catorce días en las condiciones indicadas en el apartado de Material y Métodos.

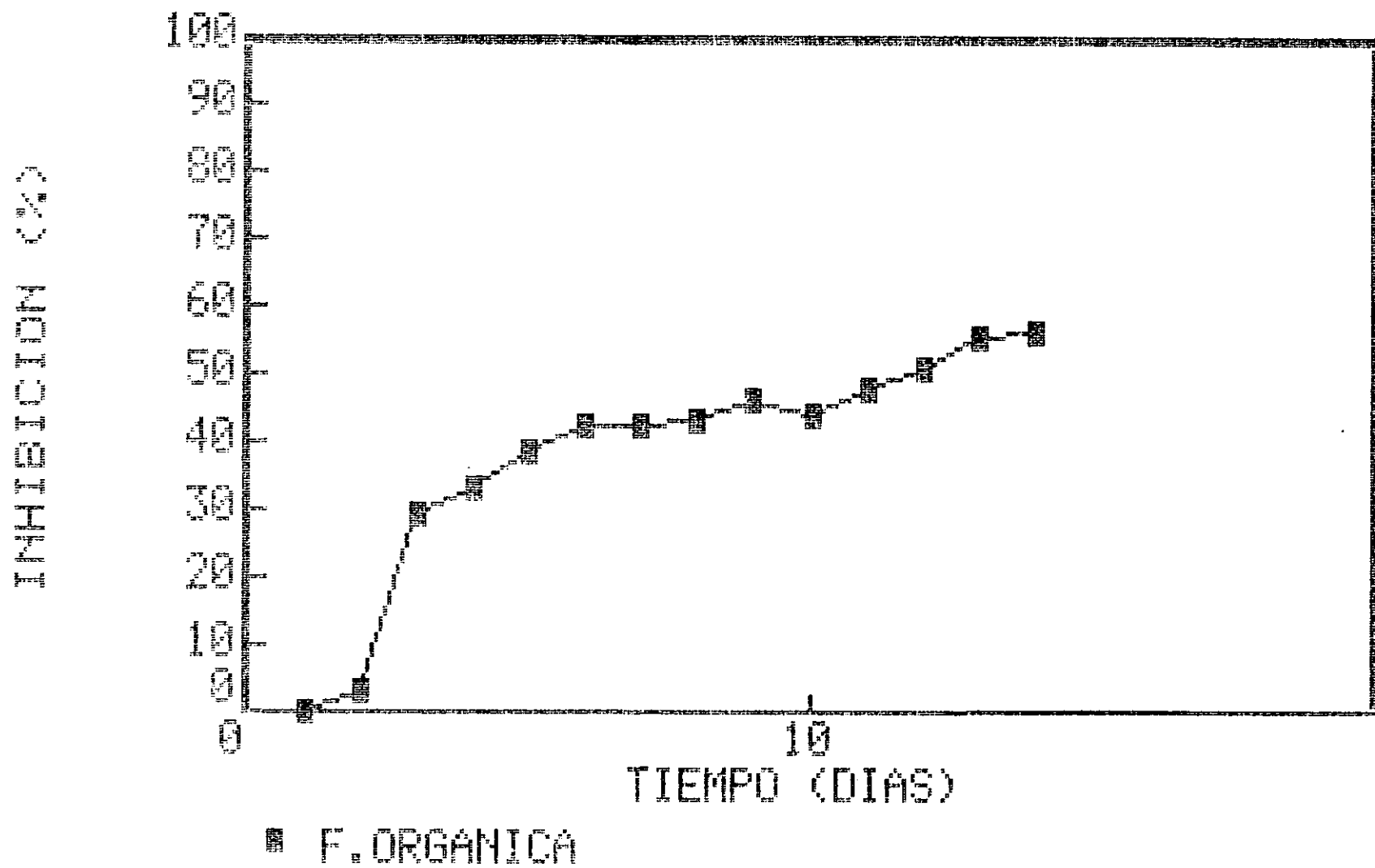
Los extractos crudos totales y las fases acuosas no presentaron actividad antibiótica sobre este microorganismo.

Los valores de inhibición observados son los siguientes:

Días de desarrollo del cultivo del que procede el extracto	Porcentaje de inhibición
1	0.0
2	3.1
3	29.4
4	33.6
5	38.7
6	42.5
7	42.5
8	43.1
9	46.7
10	44.5
11	48.3
12	51.2
13	55.6
14	56.7

STREPTOCOCCUS FAECALIS

Gráfica número 4.- Porcentajes de inhibición del desarrollo de Streptococcus faecalis.



En la Gráfica número 5 se esquematizan los porcentajes de inhibición del desarrollo de Pseudomonas aeruginosa debidos a la acción del extracto crudo total (E.C.T.) y de las fases orgánicas (F.O.) del medio de cultivo en el que se desarrollaron las cepas del género Arthrini a lo largo de catorce días en las condiciones indicadas en el apartado de Material y Métodos.

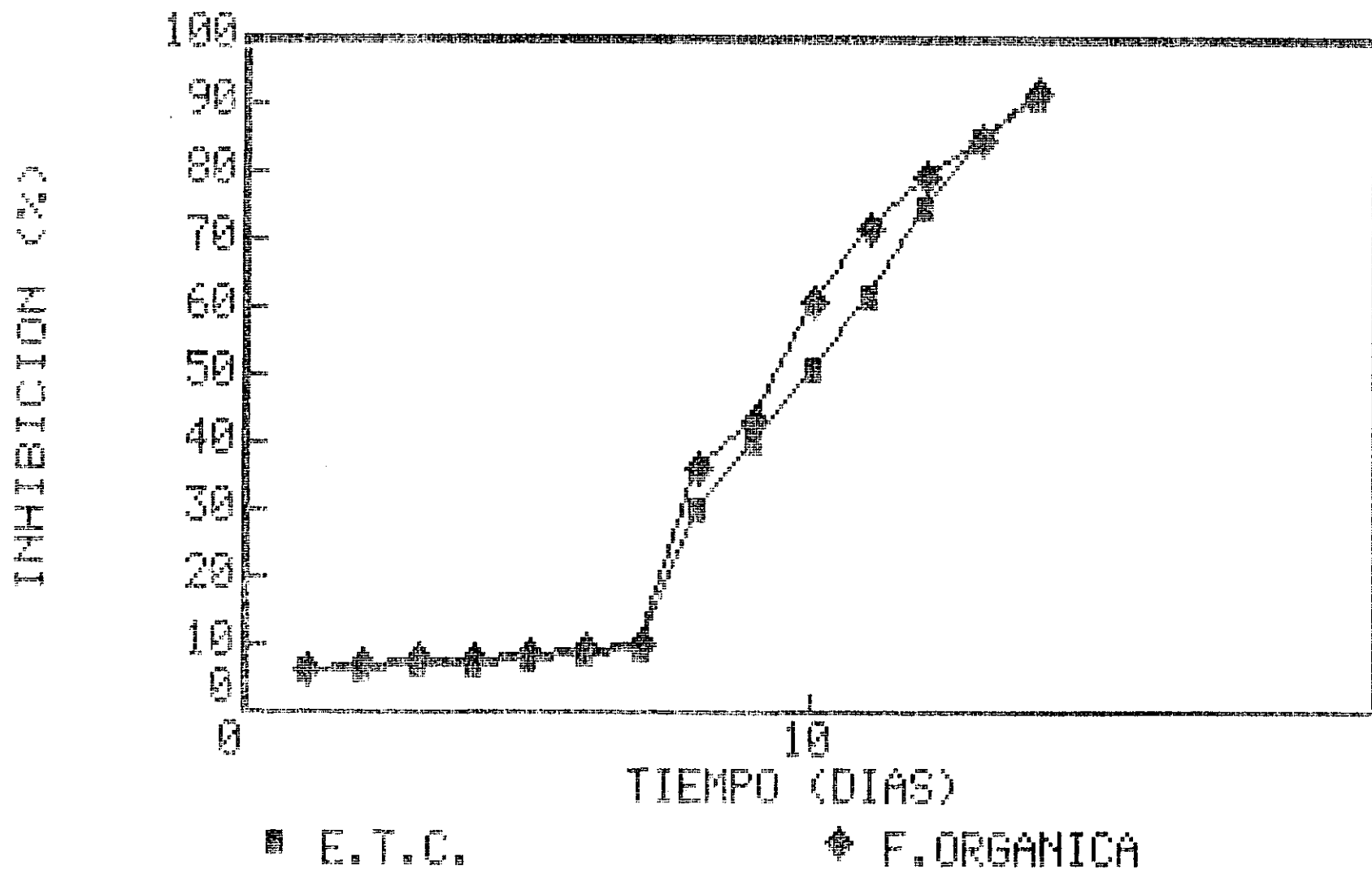
Las fases acuosas no presentaron actividad antibiótica sobre este microorganismo.

Los valores de inhibición observados son los siguientes:

Días de desarrollo del cultivo del que procede el extracto	Porcentaje de inhibición	
	E.T.C.	F.O.
1	6.40	6.90
2	6.80	7.50
3	7.00	8.00
4	7.40	8.30
5	8.00	8.60
6	8.90	9.30
7	9.70	10.30
8	30.30	36.20
9	40.70	43.80
10	50.80	61.40
11	61.60	72.10
12	74.80	79.80
13	84.70	85.30
14	91.00	92.30

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Gráfica número 5. - Porcentajes de inhibición del desarrollo de Pseudomonas aeruginosa.



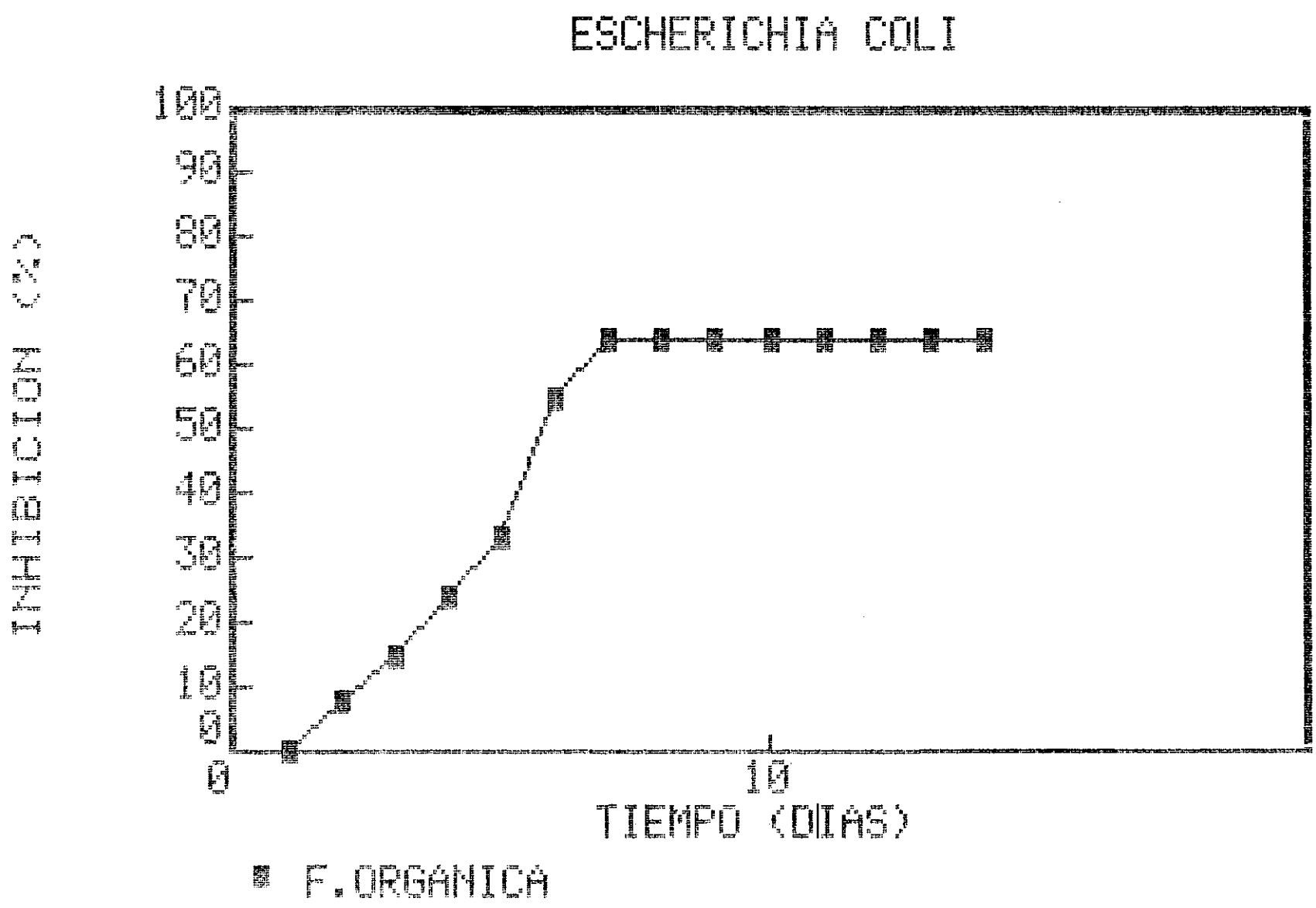
En la Gráfica número 6 se esquematizan los porcentajes de inhibición del desarrollo de Escherichia coli debidos a la acción de las fases orgánicas del medio de cultivo en el que se desarrollaron las cepas del género Arthriniun a lo largo de catorce días en las condiciones indicadas en el apartado de Material y Métodos.

Los extractos crudos totales y las fases acuosas no presentaron actividad antibiótica sobre este microorganismo.

Los valores de inhibición observados son los siguientes:

Días de desarrollo del cultivo del que procede el extracto	Porcentaje de inhibición
1	0.0
2	8.0
3	15.3
4	24.6
5	33.2
6	54.8
7	64.1
8	64.6
9	64.3
10	64.5
11	64.4
12	64.0
13	63.9
14	64.0

Gráfica número 6. - Porcentajes de inhibición del desarrollo de Escherichia coli.



En la Gráfica número 7 se esquematizan los porcentajes de inhibición del desarrollo de Candida albicans debidos a la acción de las fases ~~orgánicas del medio~~ de cultivo en el que se desarrollaron las cepas del género Arthriniun a lo largo de catorce días en las condiciones indicadas en el apartado de Material y Métodos.

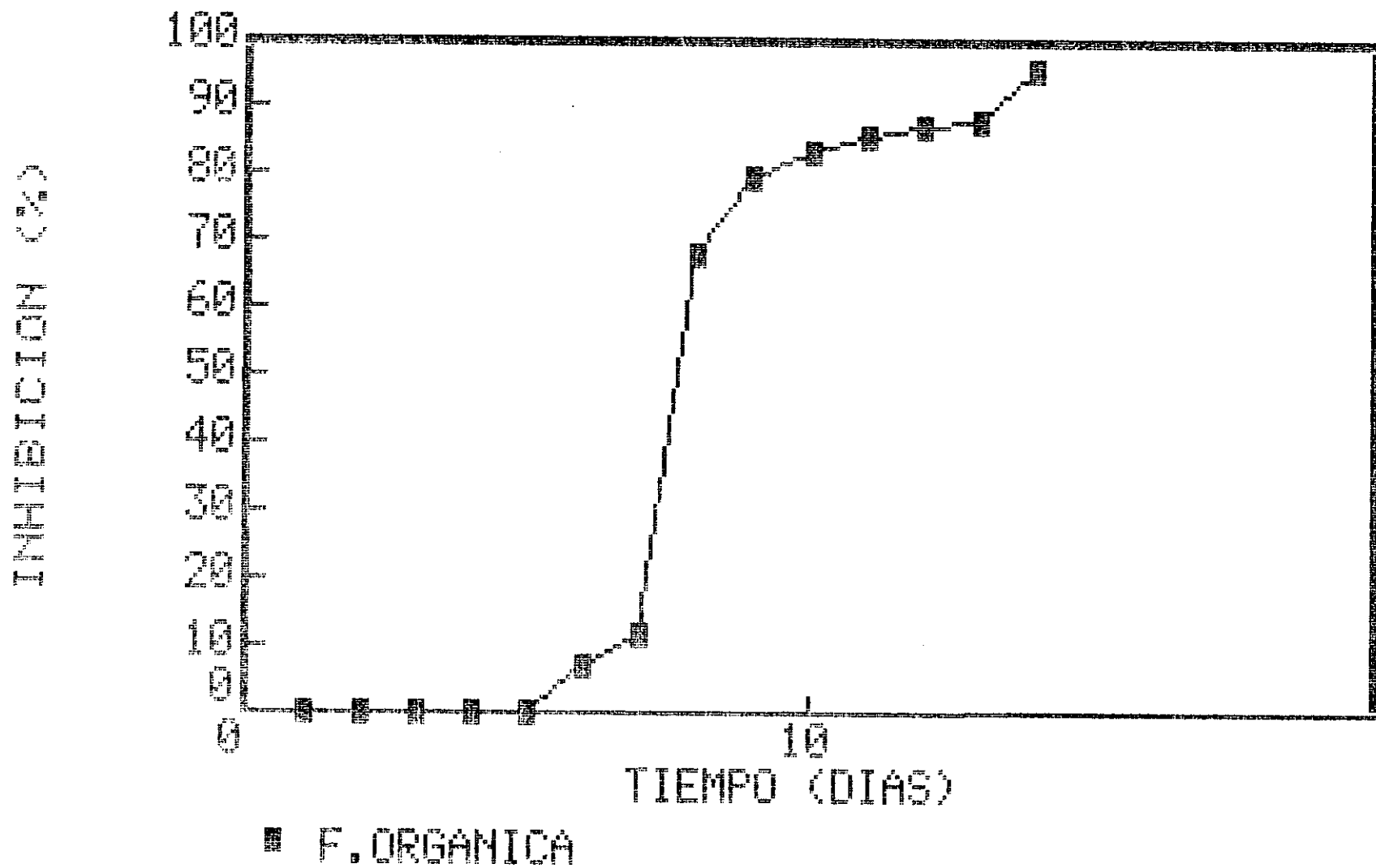
Los extractos crudos totales y las fases acuosas no presentaron actividad antibiótica sobre este microorganismo.

Los valores de inhibición observados son los siguientes:

Días de desarrollo del cultivo del que procede el extracto	Porcentaje de inhibición
1	0.0
2	0.0
3	0.0
4	0.0
5	0.0
6	7.5
7	12.0
8	68.3
9	79.6
10	83.1
11	85.4
12	87.2
13	88.4
14	96.1

CANDIDA ALBICANS

Gráfica número 7.- Porcentajes de inhibición del desarrollo de *Candida albicans*.



4.1.7. Resultados obtenidos tras la realización de las cromatografías en capa fina de los extractos crudos totales obtenidos de cultivos de siete, catorce y veintiun días de las cepas del género Arthrinium.

En la Tabla número 16 se hallan resumidos los resultados obtenidos tras la realización de las cromatografías en cloroformo/acetato de etilo/ácido acético (6:3:1) en placas cromatográficas con indicador de fluorescencia.

En la Tabla número 17 se indican los resultados obtenidos a partir del desarrollo de las cromatografías en cloroformo/acetato de etilo/ácido acético (6:3:1) en placas cromatográficas sin indicador de fluorescencia.

En la Tabla número 18 se suman los resultados obtenidos tras la realización de las cromatografías en benceno/metanol/ácido acético (24:2:1) en placas con indicador de fluorescencia.

En la Tabla número 19 se pueden observar los resultados obtenidos tras la realización de las cromatografías en benceno/metanol/ácido acético (24:2:1) en placas sin indicador de fluorescencia.

En todos los casos los resultados fueron obtenidos tras la lectura y observación de las placas cromatográficas desarrolladas bajo lámpara de 254 y 365 nm de longitud de onda.

En las Tablas sólo se aportan los valores relativos a las cepas en las que se detectaron una o más huellas cromatográficas. Se indican asimismo resultados de extractos de siete, catorce y veintiun días de desarrollo de las cepas.

ESPECIE CEPA T. INCUBACION Rf (=254nm) Rf (=365nm)

<u>A. aureum</u>	A1	7 días	---	---
		14 días	---	0.97
		21 días	---	---
<u>A. georgii</u>	A12	7 días	0.26	---
		14 días	0.40	---
			0.56	
			0.72	
			0.85	
	21 días		0.26	0.26
			0.72	0.72
<u>A. hispanicus</u>	A14	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.72	0.72
<u>A. marii</u>	A16	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.56	0.56
	A18		0.72	0.72
		7 días	---	---
		14 días	0.72	0.72
		21 días	0.26	0.26
			0.40	0.40
			0.72	0.72
	A19	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.56	0.56

Tabla núm. 16 .- Resultados obtenidos tras la realización de las cromatografías en cloroformo: acetato de etilo: ácido acético glacial (6:3:1), en placas con indicador de fluorescencia. (---: no presencia de huellas cromatográficas).

ESPECIE	CEPA	T. INCUBACION	Rf (=254nm)	Rf (=365nm)
---------	------	---------------	--------------	--------------

<u>A. saccharicola</u>	A36	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.26	0.26
	A38	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.56 0.72	0.56 0.72
<u>A. serenensis</u>	A41	7 días	0.72	0.72
			0.82	0.82
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. urticae</u>	A43	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.97	0.97

Tabla núm. 16.- (continuación)

ESPECIE	CEPA	T. INCUBACION	Rf (=254nm)	Rf (=365nm)

<u>A. aureum</u>	A1	7 días	---	0.36
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. arundinis</u>	A8	7 días	0.64	---
		14 días	---	---
		21 días	0.91 0.99	---
<u>A. georgii</u>	A12	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.26 0.51 0.79	0.26 0.51 0.79
<u>A. hispanicus</u>	A14	7 días	0.72	0.72
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. marii</u>	A16	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.79	0.79
	A18	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.79	0.79
	A19	7 días	---	0.72
		14 días	---	---
		21 días	---	0.72

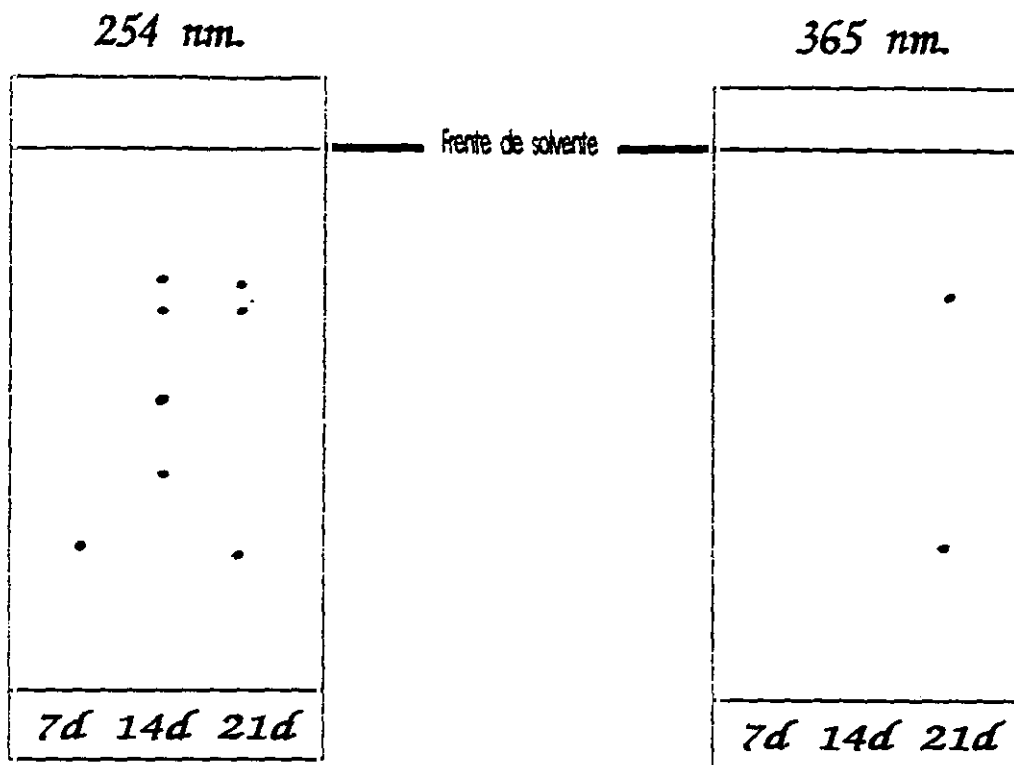
 Tabla núm. 17 .- Resultados obtenidos tras la realización de las cromatografías en cloroformo: acetato de etilo: ácido acético glacial (6:3:1), en placas sin indicador de fluorescencia. (---: no presencia de huellas cromatográficas).

ESPECIE	CEPA	T. INCUBACION	Rf (=254nm)	Rf (=365nm)
---------	------	---------------	--------------	--------------

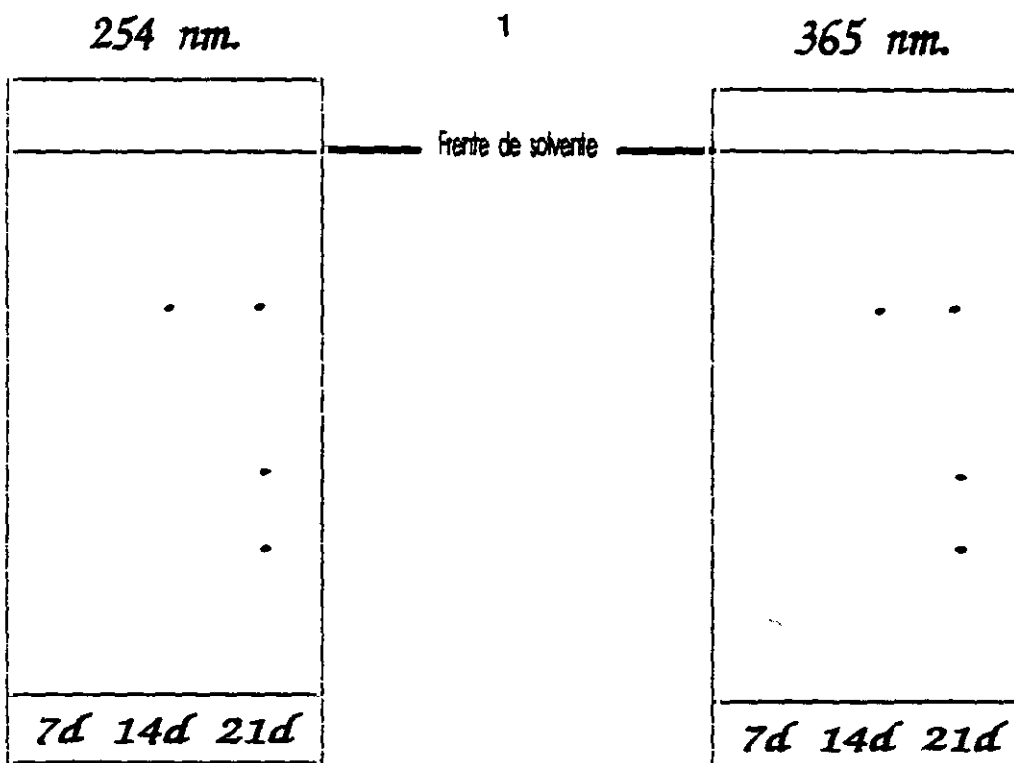
<u>A. philippi</u>	A28	7 días	---	---
		14 días	0.72	0.72
		21 días	---	---
<u>A. puccinoides</u>	A31	7 días	---	---
		14 días	0.72	0.72
		21 días	---	---
<u>A. saccharicola</u>	A36	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.26	0.26
	A38	7 días	0.72	0.72
		14 días	---	---
		21 días	0.72	0.72
<u>A. serenensis</u>	A41	7 días	0.72	0.72
		14 días	---	---
		21 días	---	---

Tabla núm. 17.- (continuación)

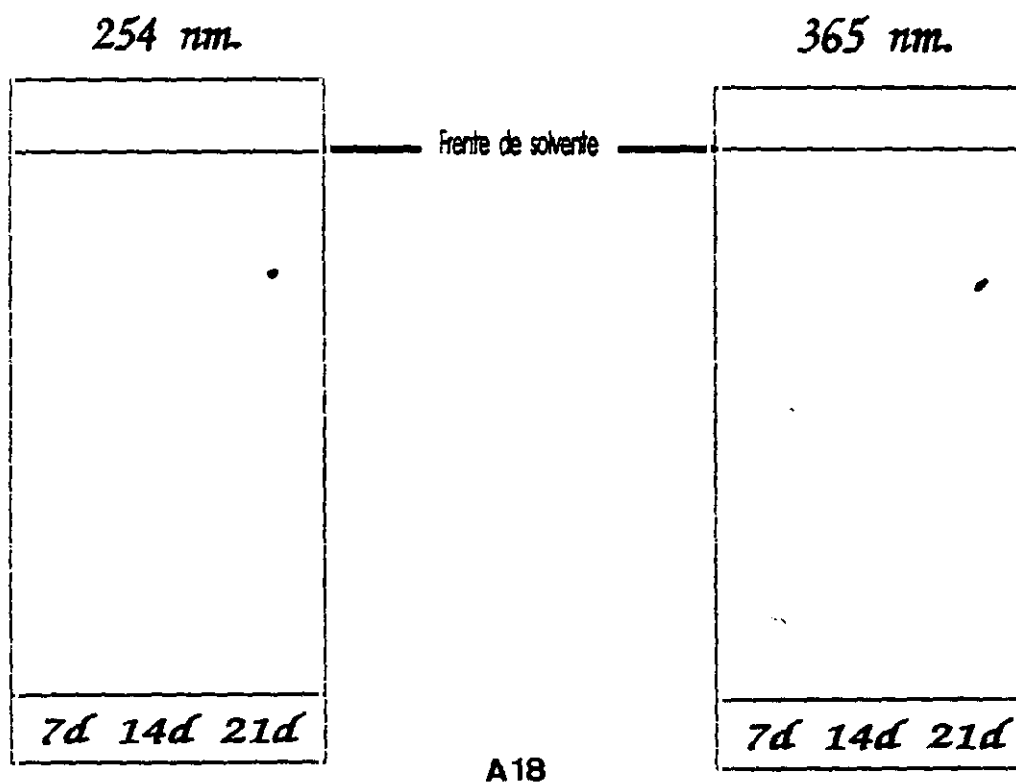
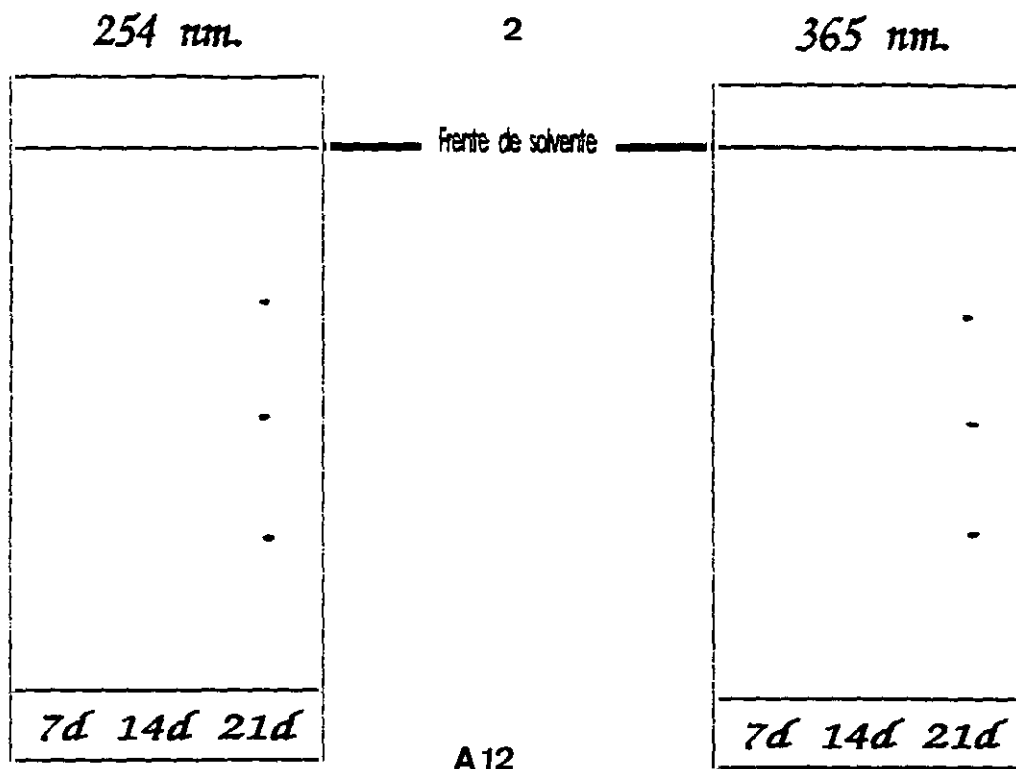
1



A 12



A 18



ESPECIE CEPA T. INCUBACION Rf (=254nm) Rf (=365nm)

<u>A. aureum</u>	A1	7 días	---	0.66
		14 días	---	0.42
		21 días	---	---
	A2	7 días	---	0.66
		14 días	---	---
		21 días	---	---
	A4	7 días	---	0.42
		14 días	---	---
		21 días	---	---
	A5	7 días	---	0.42
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. arundinis</u>	A8	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.26	0.26
<u>A. georgii</u>	A12	7 días	---	---
		14 días	0.26	0.26
		21 días	---	---
<u>A. hispanicus</u>	A13	7 días	0.26	0.26
		14 días	---	---
		21 días	---	---
	A14	7 días	0.26	0.26
		14 días	---	---
		21 días	---	---

Tabla núm. 18.- Resultados obtenidos tras la realización de las cromatografías en benceno:metanol:ácido acético glacial (24:2:1), en placas con indicador de fluorescencia. (---: no presencia de huellas cromatográficas).

ESPECIE CEPA T. INCUBACION Rf (=254nm) Rf (=365nm)

<u>A. javii</u>	A15	7 días	---	---
		14 días	0.26	0.26
		21 días	---	---
<u>A. marii</u>	A16	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	---	0.54
	A18	7 días	---	---
		14 días	0.16	0.16
		21 días	0.26	0.26
	A19	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	---	---
	A20	7 días	0.78	---
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. mediterranii</u>	A21	7 días	0.26	0.26
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. phaeospermum</u>	A23	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	---	0.54
	A26	7 días	0.26	0.26
		14 días	---	---
		21 días	---	0.54
<u>A. philippi</u>	A28	7 días	0.64	0.33
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. puccinoides</u>	A31	7 días	0.88	---
		14 días	---	---
		21 días	---	---

ESPECIE	CEPA	T. INCUBACION	Rf (=254nm)	Rf (=365nm)

<u>A. aureum</u>	A1	7 días	0.35	0.35
		14 días	0.35	0.35
		21 días	---	---
	A2	7 días	0.35	0.35
		14 días	---	---
		21 días	---	---
	A4	7 días	---	0.42
		14 días	---	---
		21 días	---	---
	A5	7 días	0.42	0.42
		14 días	0.42	0.42
		21 días	0.98	0.98
<u>A. arundinis</u>	A8	7 días	0.64	---
		14 días	---	---
		21 días	0.64	---
<u>A. georgii</u>	A12	7 días	---	---
		14 días	0.26	0.26
		21 días	---	---
<u>A. hispanicus</u>	A13	7 días	---	---
		14 días	0.26	0.26
		21 días	---	---
	A14	7 días	0.26	0.26
		14 días	0.26	0.26
		21 días	---	---

Tabla núm. 19 .- Resultados obtenidos tras la realización de las cromatografías en benceno:metanol:ácido acético glacial (24:2:1), en placas sin indicador de fluorescencia. (---: no presencia de huellas cromatográficas).

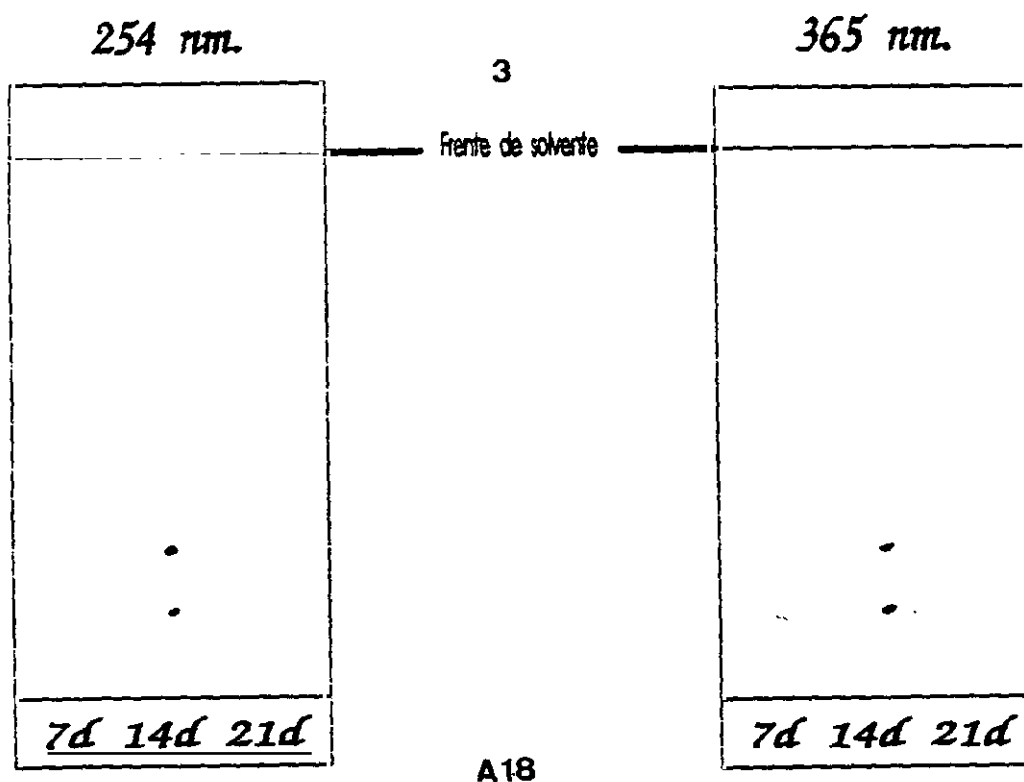
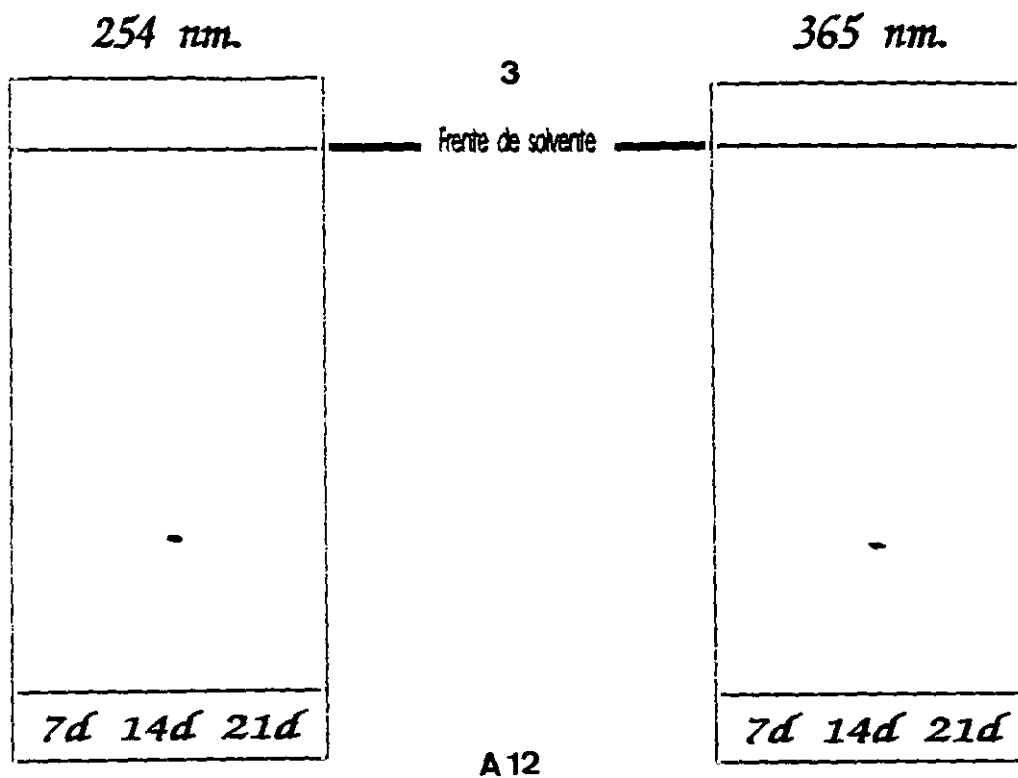
ESPECIE	CEPA	T. INCUBACION	Rf (=254nm)	Rf (=365nm)
---------	------	---------------	--------------	--------------

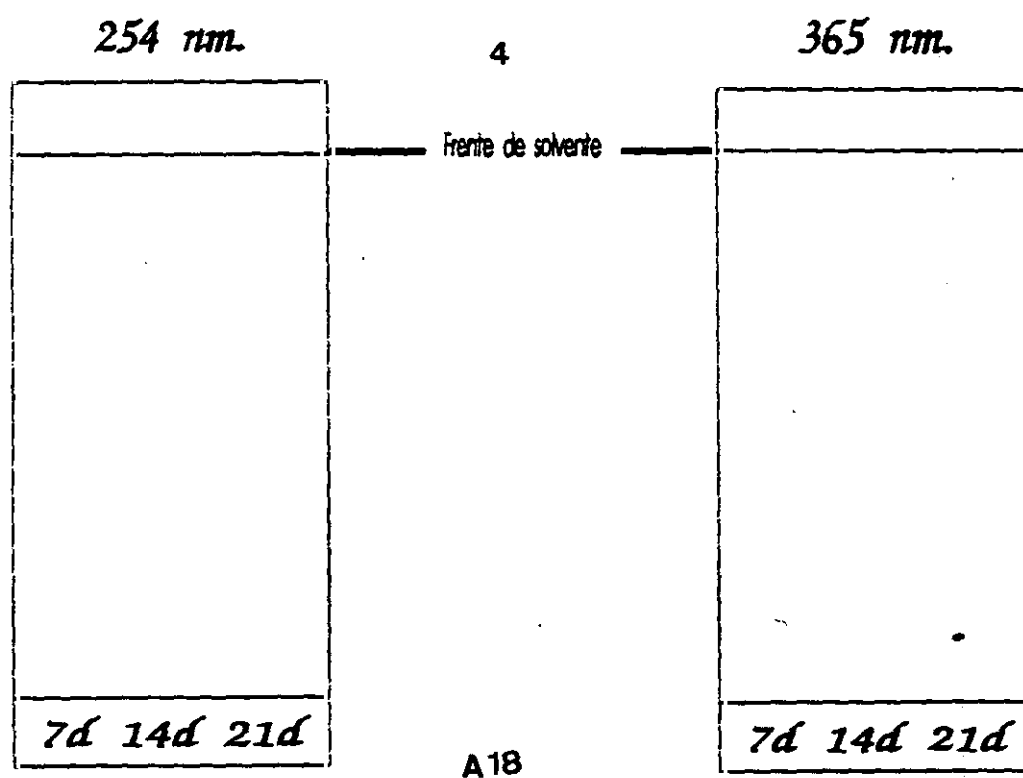
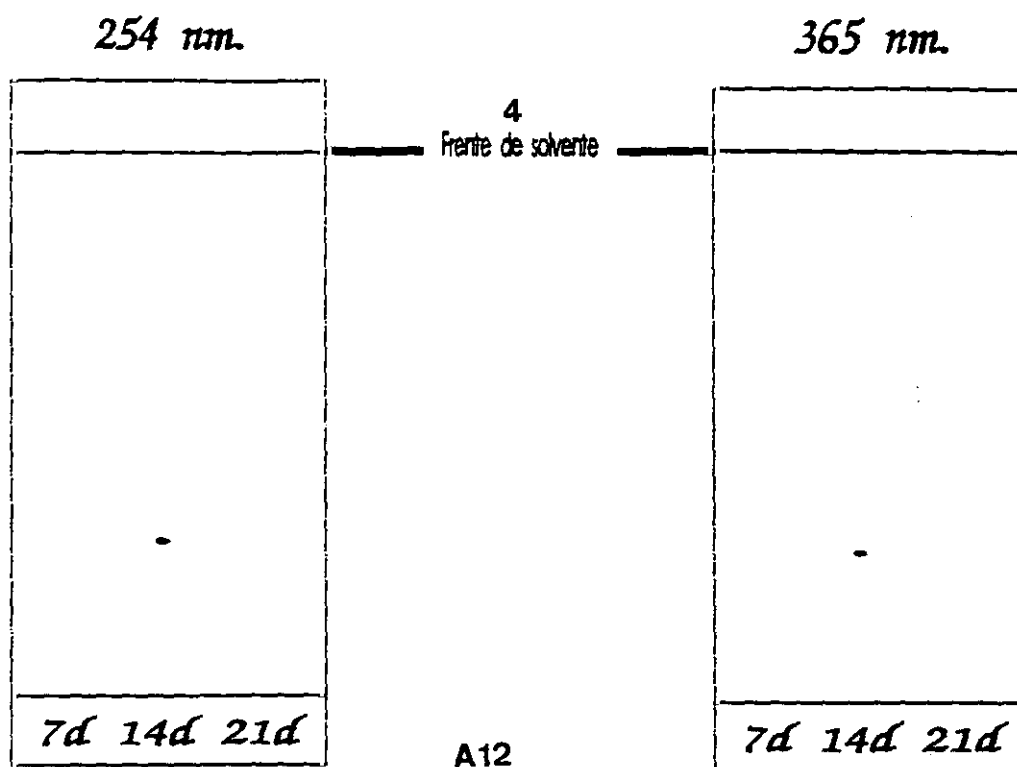
<u>A. javii</u>	A15	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	---	0.41
<u>A. marii</u>	A16	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	---	0.10
	A18	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	---	0.10
	A19	7 días	---	---
		14 días	0.16	0.16
		21 días	---	---
	A20	7 días	---	---
		14 días	0.16	0.16
		21 días	---	0.28
<u>A. mediterranii</u>	A21	7 días	0.26	0.26
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. phaeospermum</u>	A23	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	---	0.54
	A26	7 días	0.26	0.26
		14 días	---	---
		21 días	---	0.54
<u>A. philippi</u>	A28	7 días	0.64	0.33
		14 días	0.10	0.10
		21 días	0.64	---
<u>A. puccinoides</u>	A31	7 días	---	---
		14 días	0.10	0.10
		21 días	---	---

ESPECIE	CEPA	T. INCUBACION	Rf (=254nm)	Rf (=365nm)
---------	------	---------------	--------------	--------------

<u>A. saccharicola</u>	A36	7 días	0.10	0.10
		14 días	---	---
		21 días	0.26	0.26
				0.42
	A37	7 días	---	---
		14 días	---	---
		21 días	0.10	0.10
			0.26	0.26
			0.35	0.52
	A38	7 días	---	0.47
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. serenensis</u>	A41	7 días	0.26	0.26
		14 días	---	---
		21 días	---	---
<u>A. urticae</u>	A43	7 días	0.26	0.26
			---	0.51
		14 días	---	---
		21 días	---	---

Tabla núm. 19.- (continuación)





3: benceno / metanol / ácido acético
(24:2:1). Las placas poseían indi-
cador de fluorescencia.

4: benceno / metanol / ácido acético
(24:2:1). Las placas no poseían
indicador de fluorescencia.

En la Tabla sólo se aportan los valores relativos a
las cepas en las que se detectaron actividades.

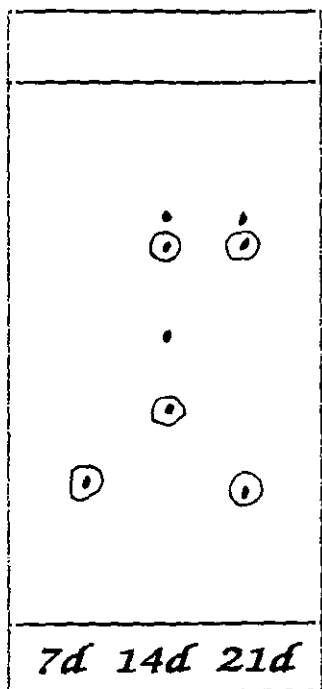
Se indican asimismo resultados de extractos de siete,
catorce y veintiun días de desarrollo de las cepas del
género Arthrinium.

ESPECIE	CEPA	T. incubación	1	2	3	4
<hr/>						
<u>A. aureum</u>	A2	7 días			+	+
	A4	7 días				+
	A5	7 días			+	+
<u>A. arundinis</u>	A8	21 días		+	+	+
<u>A. georgii</u>	A12	7 días	+			+
		14 días	+		+	+
		21 días	+	+		
<u>A. hispanicus</u>	A13	7 días				+
		14 días				+
	A14	7 días			+	
<u>A. javii</u>	A15	14 días				+
		21 días				+
<u>A. marii</u>	A16	21 días			+	
	A18	21 días	+			
	A19	14 días	+		+	
		21 días	+			
	A20	7 días			+	
		21 días	+	+	+	+

Tabla núm. 20 .- Resultados obtenidos tras la realización de las bioautografías sobre Staphylococcus aureus.

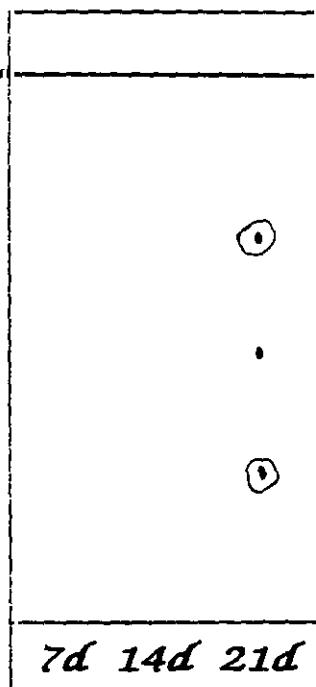
ESPECIE	CEPA	T. incubación	1	2	3	4
<hr/>						
<u>A. mediterranii</u>	A21	7 días			+	+
<u>A. phaeospermum</u>	A23	7 días		+		
	A26	7 días 21 días			+	+
<u>A. philippi</u>	A28	7 días			+	+
		14 días				+
		21 días				+
<u>A. puccinoides</u>	A31	14 días				+
<u>A. saccharicola</u>	A36	7 días		+		+
		21 días			+	+
	A37	21 días	+			
	A38	7 días		+		
		21 días	+	+	+	+
<u>A. serenensis</u>	A41	7 días	+	+	+	+
		21 días				+

Tabla núm. 20.- (continuación)



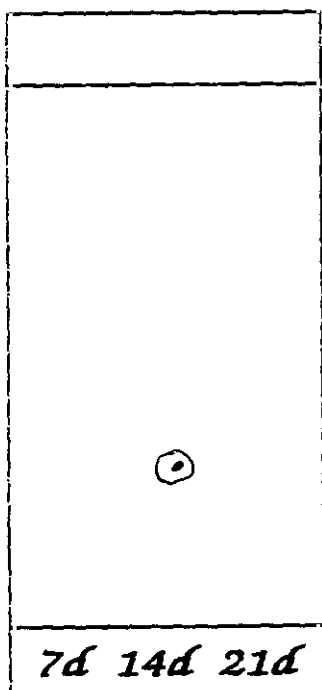
1

Frente de solvente



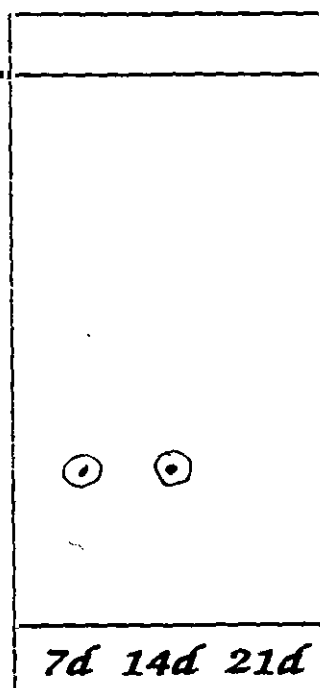
2

A12



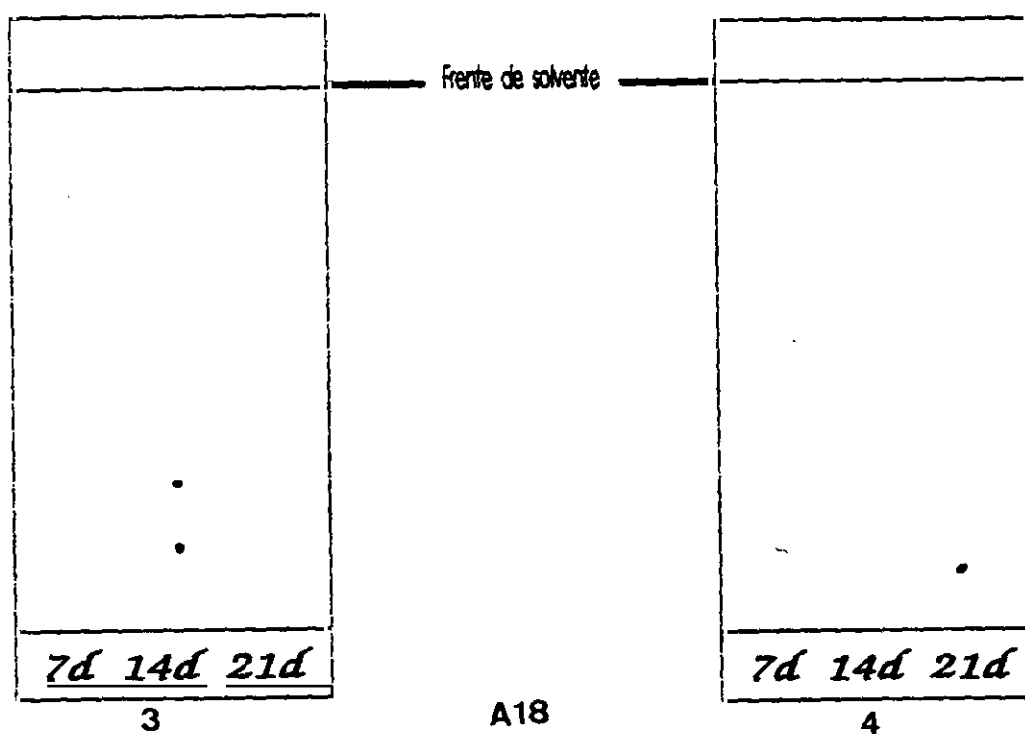
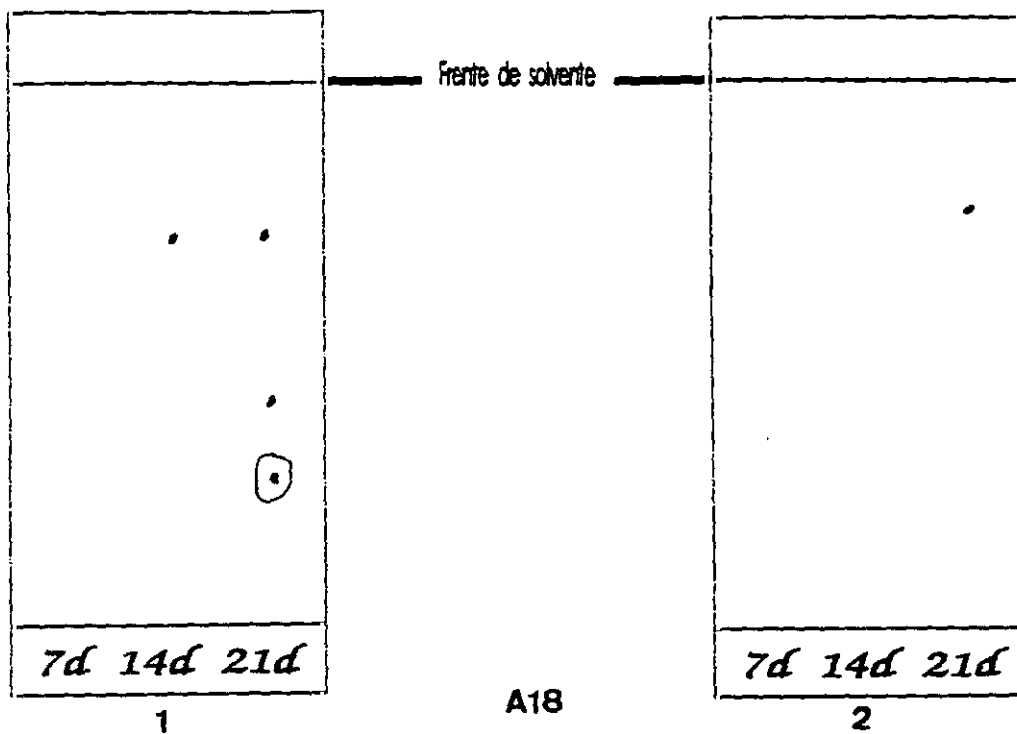
3

Frente de solvente



4

A12



4.1.9. Resultados correspondientes a la acción de agentes mutágenos sobre la capacidad inhibidora de cepas del género Arthrinium.

- Efecto de la radiación ultravioleta a diversos tiempos de actuación.

A partir de suspensiones valoradas de las cepas en estudio se realizaron siembras en los medios de cultivo preparados como se indica en el apartado correspondiente a Material y Métodos, evaluándose posteriormente el índice de supervivencia de las cepas a las distintos tiempos de exposición a la radiación ultravioleta, obteniéndose asimismo resultados relativos al ensayo control, con el fin de poder establecer el índice de supervivencia.

Este primer apartado se llevó a cabo con una cepa de cada especie, eligiendo en el caso de que se dispusiera de más de una, la cepa de referencia o el Holotipo.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla número 21.

A partir de los resultados obtenidos y dada la posible relación entre un índice de supervivencia bajo y la obtención de cepas mutantes se eligió el tiempo de exposición de 20', como óptimo para los estudios subsiguientes.

Se sometieron a la acción de la luz ultravioleta las cuarenta y seis cepas del género en estudio y los resultados obtenidos tras una exposición, en las condiciones indicadas en el apartado de Material y Métodos, durante un espacio de tiempo de 20', permitieron obtener los índices medios de supervivencia para cada una de las cepas, valores que se resumen en la Tabla número 22.

Las cepas supervivientes fueron seleccionadas con el fin de diferenciar aquellas que presentaban modificaciones morfológicas observables macroscópicamente, resemebrándose estas cepas con el fin de determinar si la variación de caracteres observados era estable, por lo que se consideraban mutaciones o reversiones con lo que simplemente fueron calificados de adaptaciones a las condiciones de incubación y del medio.

Entre las cepas aisladas se determinó la presencia de algunas con aspectos macroscópicamente diferenciales de los relativos a las cepas control (no sometidas a las radiaciones ultravioletas), que mantuvieron su aspecto diferencial tras sucesivas resiembras, por lo que fueron consideradas cepas mutadas.

A partir de estas cepas, consideradas mutaciones fueron realizados nuevamente ensayos de actividad inhibidora con el fin de determinar si la mutación observada se acompañaba además de un incremento en la producción de metabolitos con capacidad inhibidora. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla número 23.

INDICE DE SUPERVIVENCIA

ESPECIE	CEPA	20'
<hr/>		
<u>A. aureum</u>	A1	2.67%
	A2	2.54%
	A3	3.17%
	A4	2.50%
	A5	2.65%
<u>A. arundinis</u>	A6	1.76%
	A7	1.87%
	A8	1.64%
	A9	1.98%
	A10	1.68%
<u>A. francii</u>	A11	2.89%
<u>A. georgii</u>	A12	4.02%
<u>A. hispanicus</u>	A13	1.56%
	A14	1.67%
<u>A. javii</u>	A15	3.47%

Tabla núm. 22 .- Índice de superviviencia de las cepas del género Arthrinium tras someterlas al tratamiento con luz ultravioleta durante 20'.

INDICE DE SUPERVIVENCIA

ESPECIE	CEPA	20'
<hr/>		
<u>A. marii</u>	A16	2.13%
	A17	2.08%
	A18	2.34%
	A19	2.15%
	A20	2.14%
<u>A. mediterranii</u>	A21	2.89%
	A22	2.91%
<u>A. phaeospermum</u>	A23	2.45%
	A24	2.54%
	A25	2.48%
	A26	2.53%
	A27	2.56%
<u>A. philippi</u>	A28	1.34%
<u>A. puccinoides</u>	A29	3.78%
	A30	3.45%
	A31	3.56%
	A32	3.59%
	A33	3.47%

 Tabla núm. 22.- (continuación)

INDICE DE SUPERVIVENCIA

ESPECIE	CEPA	20'
<hr/>		
<u>A. saccharicola</u>	A34	2.56%
	A35	2.34%
	A36	2.47%
	A37	2.70%
	A38	2.55%
<u>A. serenensis</u>	A39	1.76%
	A40	1.89%
	A41	1.56%
<u>A. urticae</u>	A42	1.89%
	A43	1.87%
	A44	1.98%
	A45	1.89%
	A46	1.88%

Tabla núm. 22.- (continuación)

MUTACION			
ESPECIE	CEPA	MORFOLOGICA	ACTIVIDAD

<u>A. aureum</u>	A1	+	-
	A2	-	-
	A3	+	+
	A4	+	-
	A5	-	-
<u>A. arundinis</u>	A6	-	-
	A7	-	-
	A8	+	-
	A9	-	-
	A10	-	-
<u>A. francii</u>	A11	-	-
<u>A. georgii</u>	A12	-	-
<u>A. hispanicus</u>	A13	-	-
	A14	-	-
<u>A. javii</u>	A15	-	-

Tabla núm. 23.- Detección de mutantes morfológicas o de actividad inhibidora, entre las cepas del género Arthrinium tras someterlas al tratamiento con luz ultravioleta durante 20'.

ESPECIE	CEPA	MUTACION	
		MORFOLOGICA	ACTIVIDAD

<u>A. marii</u>	A16	+	+
	A17	+	-
	A18	-	-
	A19	-	-
	A20	-	-
<u>A. mediterranii</u>	A21	+	-
	A22	-	-
<u>A. phaeospermum</u>	A23	-	-
	A24	+	-
	A25	-	-
	A26	-	-
	A27	-	-
<u>A. philippi</u>	A28	-	-
<u>A. puccinoides</u>	A29	-	-
	A30	-	-
	A31	-	-
	A32	-	-
	A33	-	-

Tabla núm. 23.- (continuación)

ESPECIE	CEPA	MUTACION	
		MORFOLOGICA	ACTIVIDAD

<u>A. saccharicola</u>	A34	+	-
	A35	-	-
	A36	-	-
	A37	-	-
	A38	-	-
<u>A. serenensis</u>	A39	+	-
	A40	-	-
	A41	-	-
<u>A. urticae</u>	A42	-	-
	A43	-	-
	A44	-	-
	A45	-	-
	A46	-	-

Tabla núm. 23.- (continuación)

- Efecto de la Nitrosoguanidina.

A partir de suspensiones valoradas de las cepas en estudio se realizaron siembras en los medios de cultivo preparados como se indica en el apartado correspondiente a Material y Métodos, evaluándose posteriormente el índice de supervivencia de las cepas en presencia de nitrosoguanidina, obteniéndose asimismo resultados relativos al ensayo control, con el fin de poder establecer el índice de supervivencia.

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla número 24.

Las cepas supervivientes fueron seleccionadas para diferenciar aquellas que presentaban modificaciones morfológicas observables macroscópicamente, resemebrándose estas cepas con el fin de determinar si la variación de caracteres observados era estable, por lo que se consideraban mutaciones o reversiones con lo que simplemente fueron calificados de adaptaciones a las condiciones en las que se realizaba la experiencia.

Entre las cepas aisladas se determinó la presencia de algunas con aspectos macroscópicamente diferenciales de los relativos a las cepas control (no sometidas a la nitrosoguanidina), que mantuvieron su aspecto diferencial tras sucesivas resiembras, por lo que fueron consideradas cepas mutadas.

A partir de estas cepas, consideradas mutaciones fueron realizados nuevamente ensayos de actividad inhibidora con el fin de determinar si la mutación observada se acompañaba además de un incremento o de una disminución significativa en la producción de metabolitos con capacidad inhibidora.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla número 25.

ESPECIE	CEPA	INDICE DE SUPERVIVENCIA
---------	------	-------------------------

<u>A. aureum</u>	A1	3.14%
	A2	3.54%
	A3	2.17%
	A4	2.46%
	A5	3.65%
<u>A. arundinis</u>	A6	2.76%
	A7	2.87%
	A8	2.43%
	A9	3.08%
	A10	3.86%
<u>A. francii</u>	A11	4.92%
<u>A. georgii</u>	A12	6.22%
<u>A. hispanicus</u>	A13	3.64%
	A14	2.56%
<u>A. javii</u>	A15	8.17%

Tabla núm. 24 .- Indice de superviviencia de las cepas del género Arthrinium tras someterlas al tratamiento con nitrosoguanidina.

ESPECIE	CEPA	INDICE DE SUPERVIVENCIA
---------	------	-------------------------

<u>A. marii</u>	A16	4.33%
	A17	3.18%
	A18	2.98%
	A19	3.34%
	A20	2.94%
<u>A. mediterranii</u>	A21	5.39%
	A22	5.67%
<u>A. phaeospermum</u>	A23	6.12%
	A24	6.78%
	A25	5.32%
	A26	5.34%
	A27	6.56%
<u>A. philippi</u>	A28	4.34%
<u>A. puccinoides</u>	A29	5.84%
	A30	5.56%
	A31	5.64%
	A32	5.34%
	A33	5.45%

Tabla núm. 24.- (continuación)

ESPECIE	CEPA	INDICE DE SUPERVIVENCIA
<hr/>		
<u>A. saccharicola</u>	A34	4.63%
	A35	3.89%
	A36	4.75%
	A37	4.67%
	A38	3.75%
<u>A. serenensis</u>	A39	7.12%
	A40	8.14%
	A41	8.78%
<u>A. urticae</u>	A42	4.67%
	A43	4.78%
	A44	5.12%
	A45	4.89%
	A46	5.08%
<hr/>		

Tabla núm. 24.- (continuación)

ESPECIE	CEPA	MUTACION	
		MORFOLOGICA	ACTIVIDAD

<u>A. aureum</u>	A1	-	-
	A2	-	-
	A3	+	-
	A4	+	-
	A5	-	-
<u>A. arundinis</u>	A6	-	-
	A7	-	-
	A8	+	-
	A9	+	-
	A10	-	-
<u>A. francii</u>	A11	-	-
<u>A. georgii</u>	A12	-	-
<u>A. hispanicus</u>	A13	-	-
	A14	+	-
<u>A. javii</u>	A15	-	-

Tabla núm. 25.- Detección de mutantes morfológicas o de actividad inhibidora, entre las cepas del género Arthrinium tras someterlas al tratamiento con nitrosoguanidina.

MUTACION

ESPECIE	CEPA	MORFOLOGICA	ACTIVIDAD
<u>A. marii</u>	A16	+	-
	A17	+	-
	A18	-	-
	A19	+	-
	A20	-	-
<u>A. mediterranii</u>	A21	+	-
	A22	+	-
<u>A. sphaeospermum</u>	A23	-	-
	A24	+	-
	A25	+	-
	A26	-	-
	A27	-	-
<u>A. philippi</u>	A28	-	-
<u>A. puccinoides</u>	A29	-	-
	A30	-	-
	A31	-	-
	A32	-	-
	A33	-	-

Tabla núm. 25.- (continuación)

En todas las cepas que se han detectado mutaciones morfológicas, éstas se han caracterizado por la ausencia de formación de conidios, observándose la formación de colonias integradas por hifas blancas y estériles, en la práctica totalidad de la superficie de la colonia.

Bajo el punto de vista de la actividad antibiótica, en la cepa A3, correspondiente a A. aureum se ha detectado una disminución de la misma, si bien en el caso de la cepa A16, correspondiente a Arthriniun marii su actividad antibiótica se vió marcadamente incrementada, tras ser tratada con radiaciones ultravioletas por espacio de 20 minutos.

4.1.10. Resultados correspondientes a la detección de partículas semejantes a virus y su relación con los cambios morfológicos y de actividad de cepas del género Arthrinium.

Las observaciones realizadas bajo el microscopio electrónico de transmisión denotan, en el caso de algunas cepas del género Arthrinium la presencia de agrupaciones de partículas de morfología repetitiva, aspecto y tamaño que permite sospechar la presencia de virus en sus hifas.

Los resultados obtenidos se observan en las Fotografías siguientes.

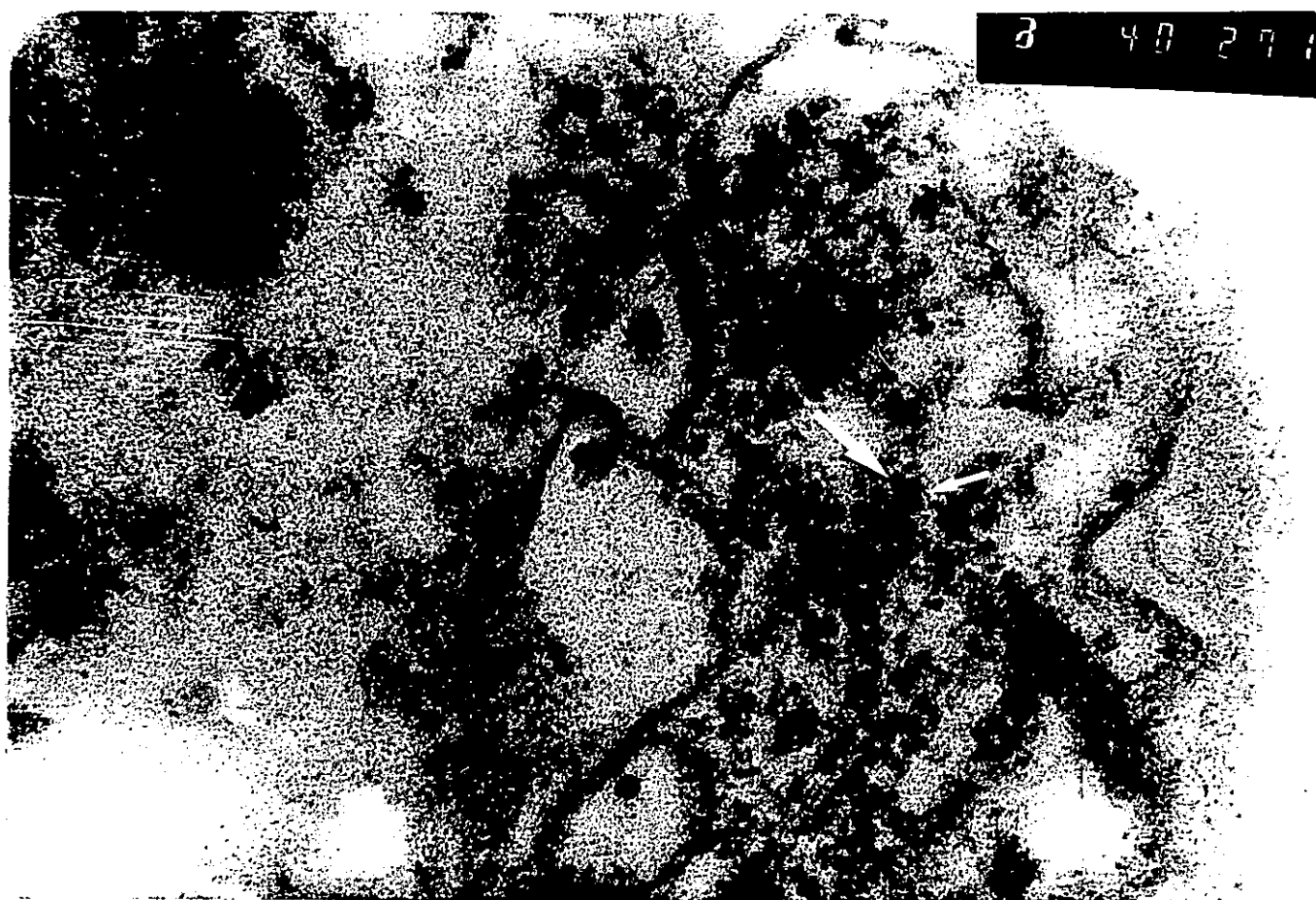
Las flechas señalan la localización de las agrupaciones de partículas semejantes a micovirus.

Las hifas procedían de cultivos que fueron también observados bajo el microscopio electrónico de barrido, y que como se demuestra en la Fotografía número 9, corresponde a cultivos en óptimas condiciones de desarrollo y de conidiogénesis (cepa salvaje) como se puede corroborar al compararlo con la Fotografía número 10, obtenida de cultivos de la misma cepa pero de aspecto anómalo o atípico y totalmente estériles (variedad morfológica).

3 30 26 11

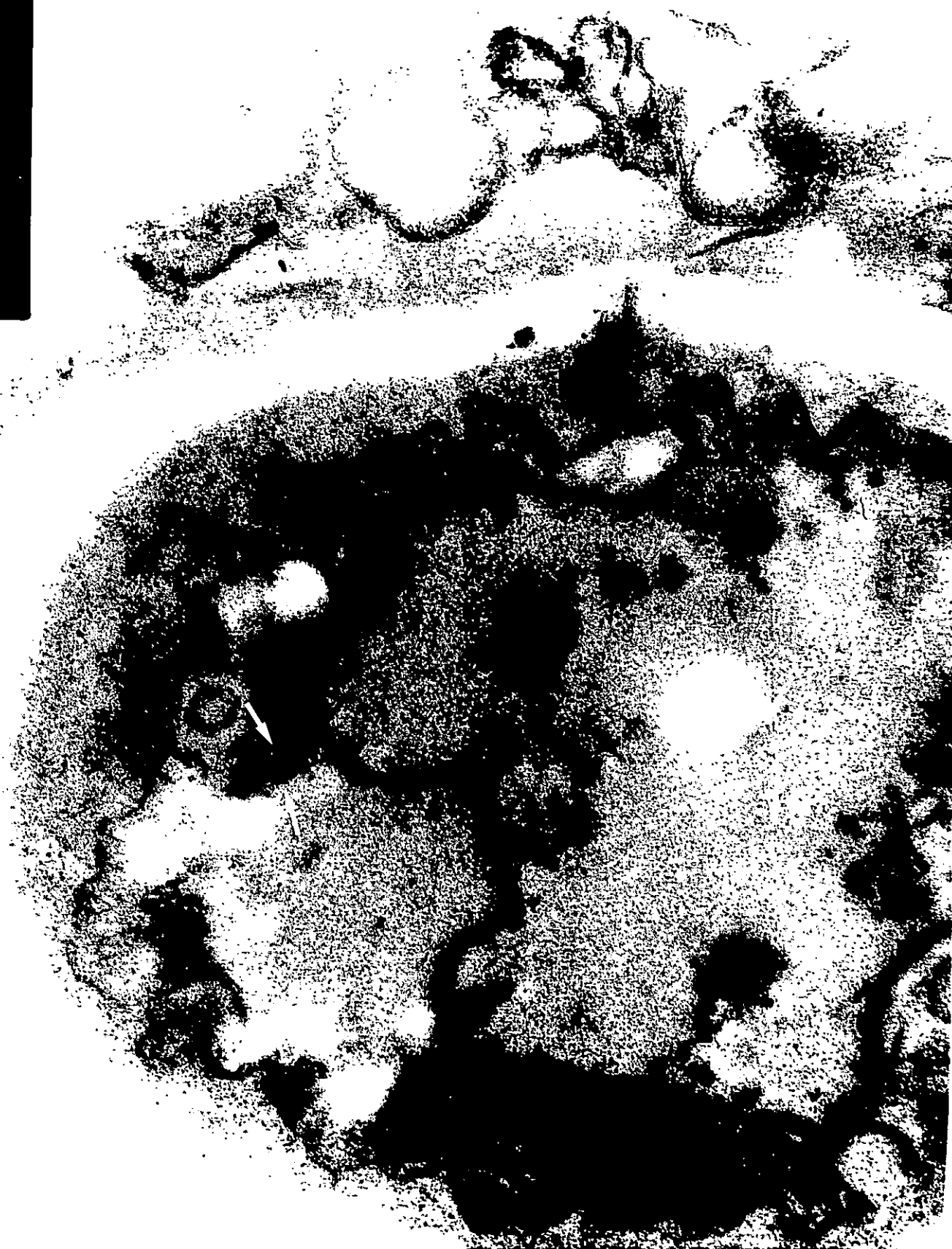


Fotografía núm. 6.- Detección de partículas semejantes a virus en cepas de Arthrini. La flecha señala la zona de acumulación de las partículas.



Fotografía núm. 7.- Detección de partículas semejantes a virus en cepas de Arthriniium. La flecha señala la zona de acumulación de las partículas.

3 30 2604



Fotografía núm. 8.- Detección de partículas semejantes a virus en cepas de Arthrinium. La flecha señala la zona de acumulación de las partículas.



Fotografía núm. 9.- Morfología típica de Arthrimum mediterranii.



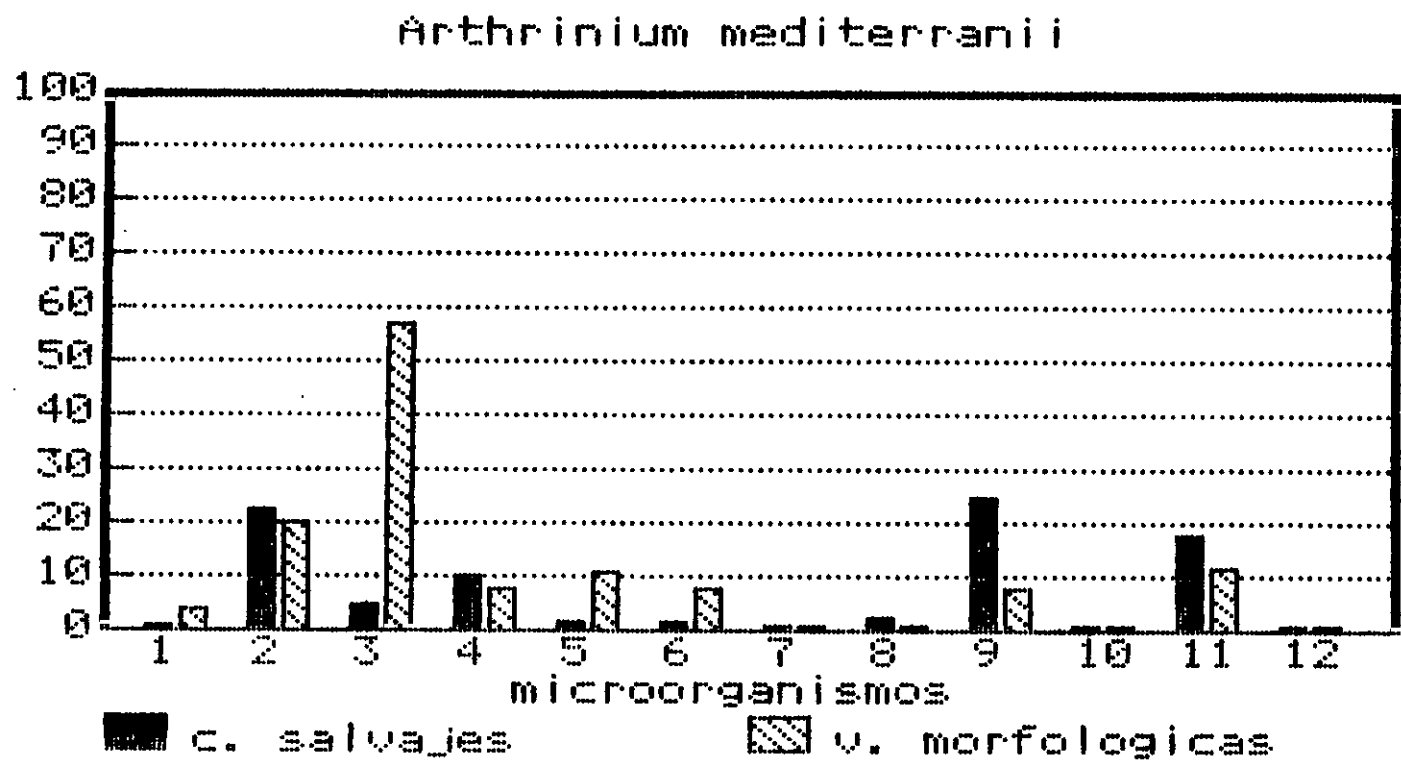
Fotografía núm. 10.- Morfología atípica de Arthriniun mediterrani.
Cultivo estéril.

La comparación entre la actividad inhibidora de los extractos obtenidos a partir del desarrollo de la cepa salvaje y de la cepa con alteraciones morfológicas se aportan en la Gráfica núm. 8.

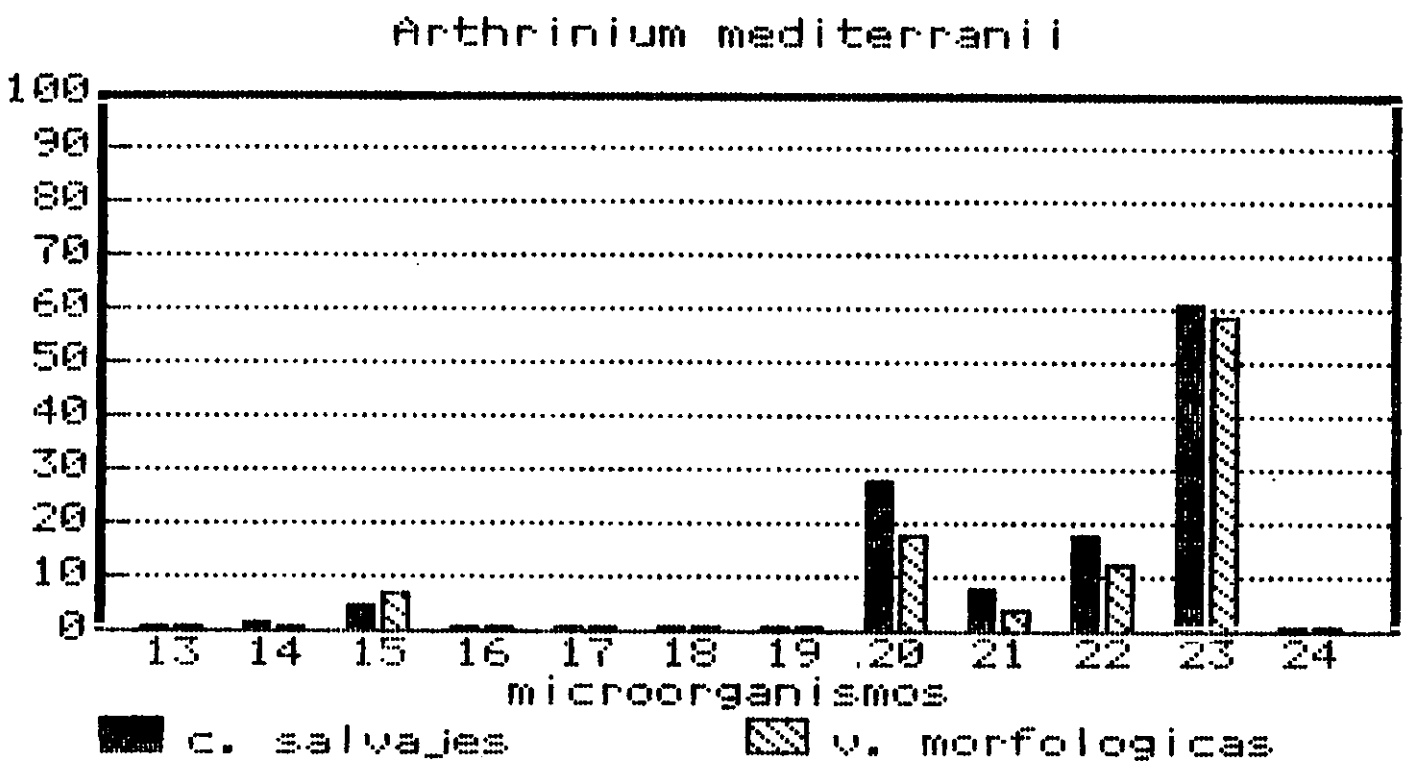
Los números relativos a las bacterias, hongos filamentosos y levaduras expresados en abcisas corresponden a los microorganismos indicados en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

Gráfica número 8

(%) actividad antimicrobiana



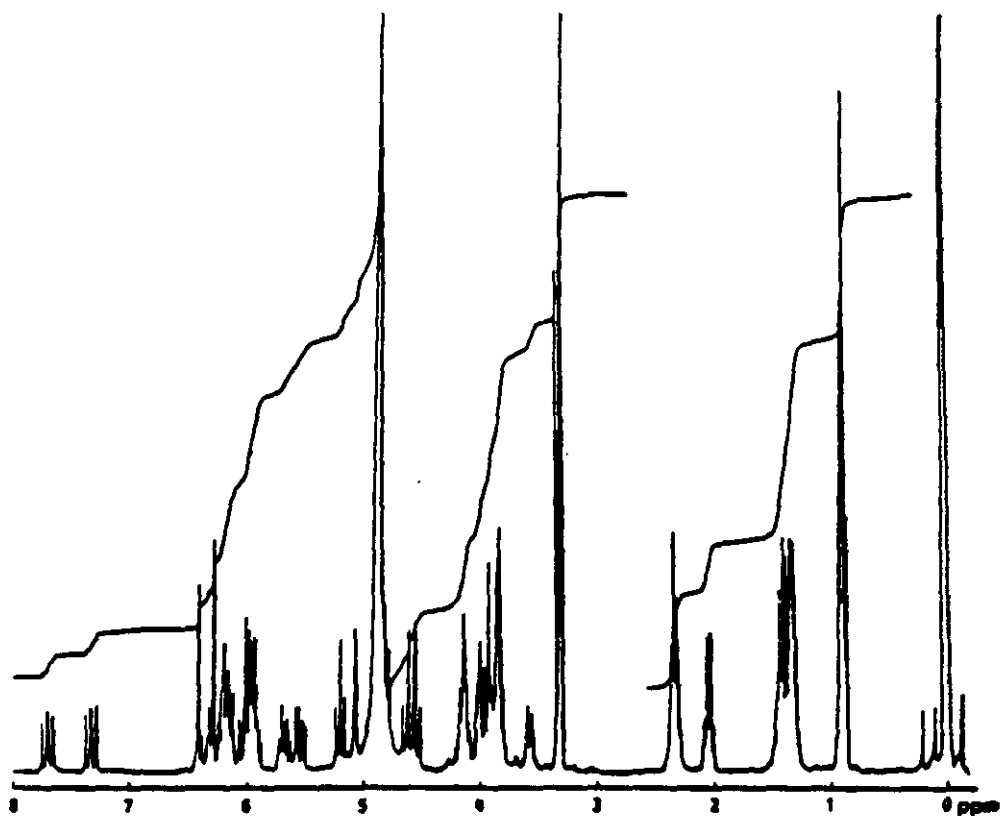
(%) *Eueiopsis* *pepini* *pepini*
Gráfica número 8 (continuación)



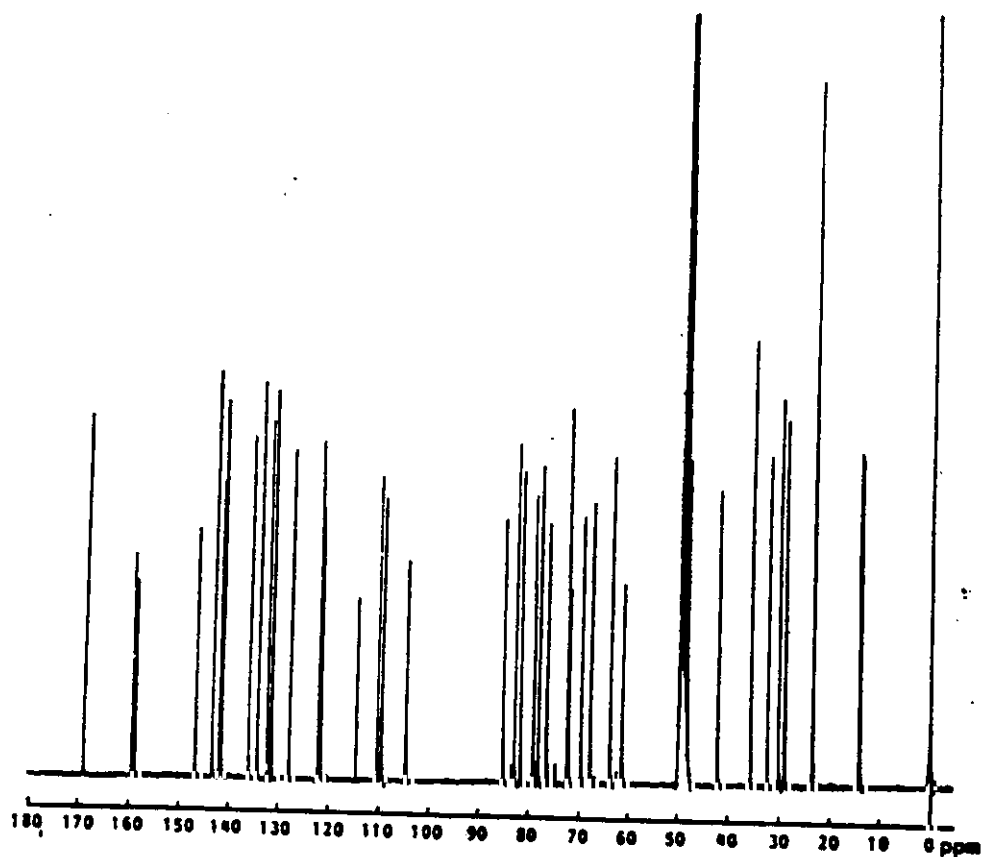
4.1.11. Resultados correspondientes a los espectros de Infrarrojo (IR) y de Resonancia magnética nuclear (RMN).

Al realizar los espectros de IR y RMN de los extractos obtenidos de las cepas en estudio se obtuvieron los resultados que se aportan en las Gráficas números 9 a 11.

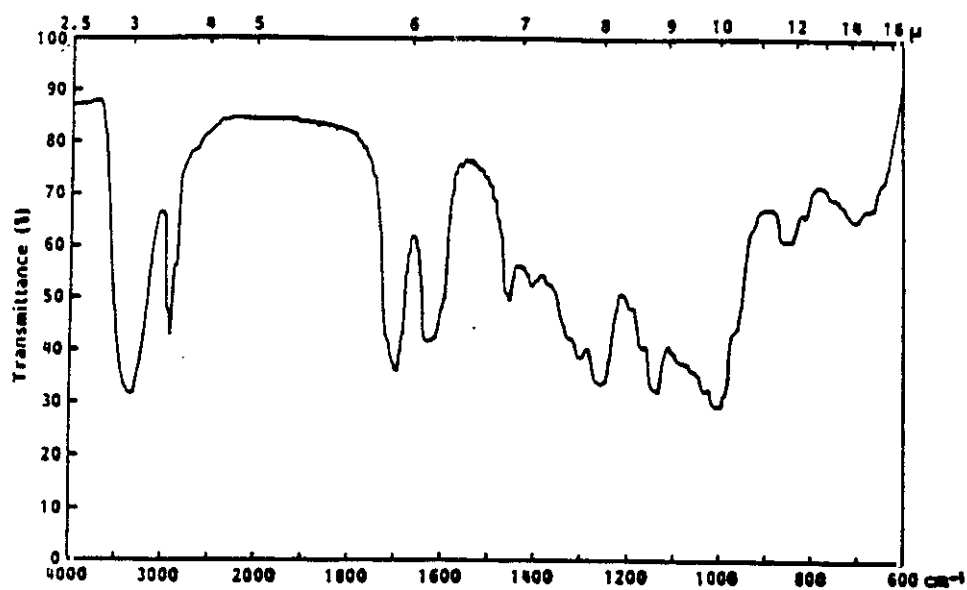
Al analizar estos espectros puede deducirse que entre los metabolitos obtenidos tras los procesos de extracción y purificación se obtuvieron derivados de la Familia de las Papulacandinas que se diferencian de las descritas hasta el presente por la presencia de radicales que incrementan su capacidad antibiótica y amplían su espectro de actividad en lo que a actividad frente a bacterias y a determinados hongos filamentosos se refiere.



Gráfica núm. 9.- Espectro de ^4H RMN de uno de los metabolitos aislados a partir de cepas del género Arthrinium.



Gráfica núm. 10.- Espectro de ^{13}C RMN de uno de los metabolitos aislados a partir de cepas del género Arthrinium.

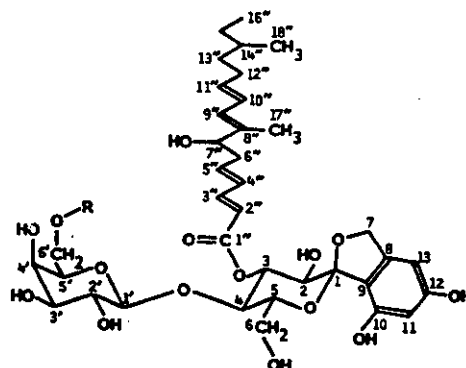


Gráfica núm. 11.- Espectro de IR de uno de los metabolitos aislados a partir de cepas del género Arthrinium.

Las características químicas del metabolito detectado pueden resumirse en:

Como todas las Papulacandinas es un derivado -C-D-glucosilado del 1,3 β -dihidroxi-5-hidroximetilbenceno (Dubois and Beau, 1992) pero a partir de las determinaciones químicas realizadas parece indicarse la presencia de un radical distinto al relativo a las papulacandinas hasta el presente descritas. Este radical puede tratarse de un grupo metilo que debería estar situado en la posición indicada con la letra R.

En el esquema siguiente se aporta la probable fórmula del metabolito obtenido. Además se ha detectado la presencia de las restantes Papulacandinas citadas en la bibliografía y que se han elaborado y acumulado por diversas cepas del género Arthrinium estudiadas.



R: -CH₃

4.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN FERMENTADOR

Los resultados correspondientes a los estudios realizados en el bioreactor, se resumen en la Gráficas siguientes.

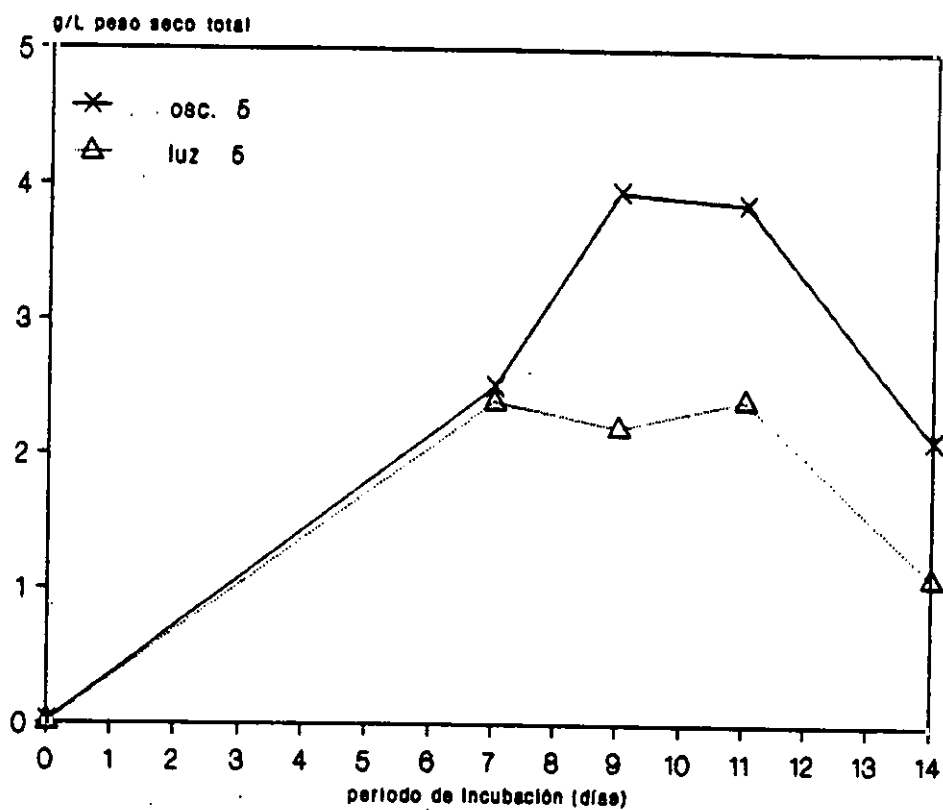
En las Gráficas números 12 a 15, se pueden observar los resultados correspondientes a la determinación del peso seco total a lo largo de catorce días de estudio, cuando la concentración de glucosa adicionada al medio de cultivo es de:

5, 10, 20 o 30 g/l

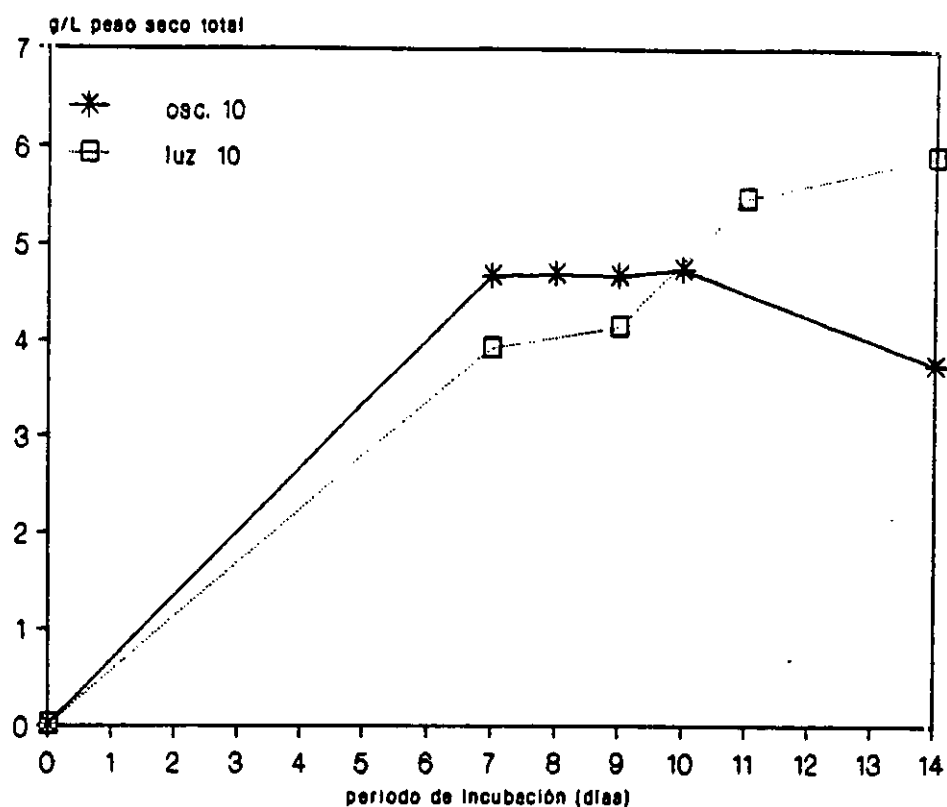
Otra variable investigada ha sido la influencia de la luz y los resultados obtenidos se pueden observar en las Gráficas indicadas.

En las Gráficas números 16 y 17 se comparan los resultados, agrupando las Gráficas en función de los dos parámetros considerados:

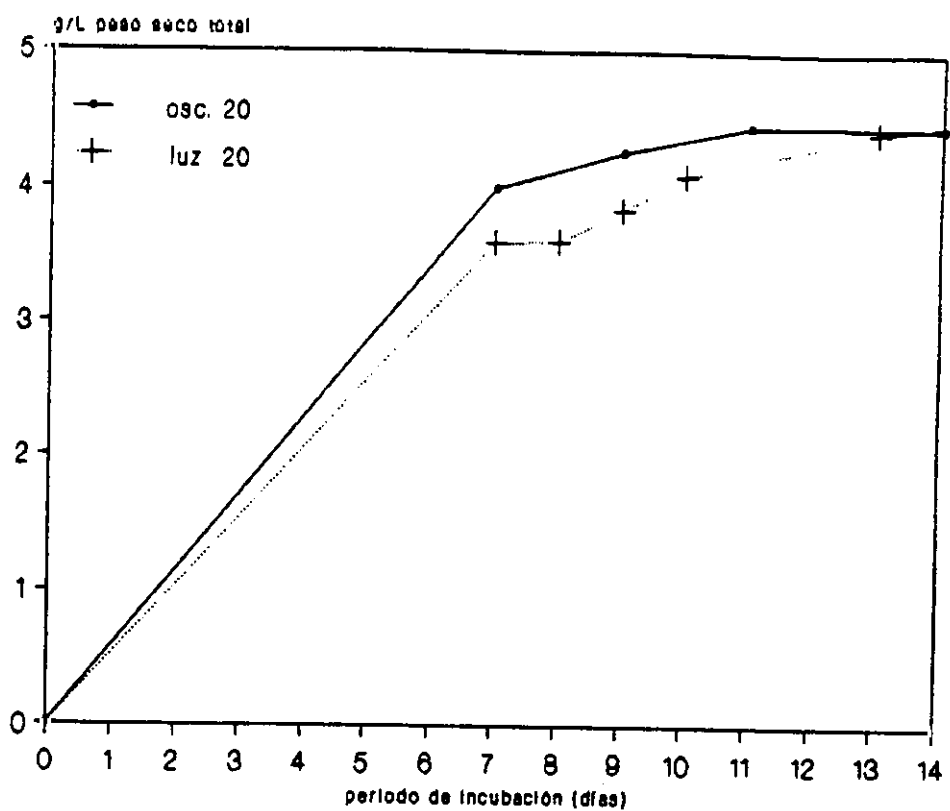
- concentración de glucosa adicionada al medio de cultivo.
- condiciones del cultivo en presencia o ausencia de luz.



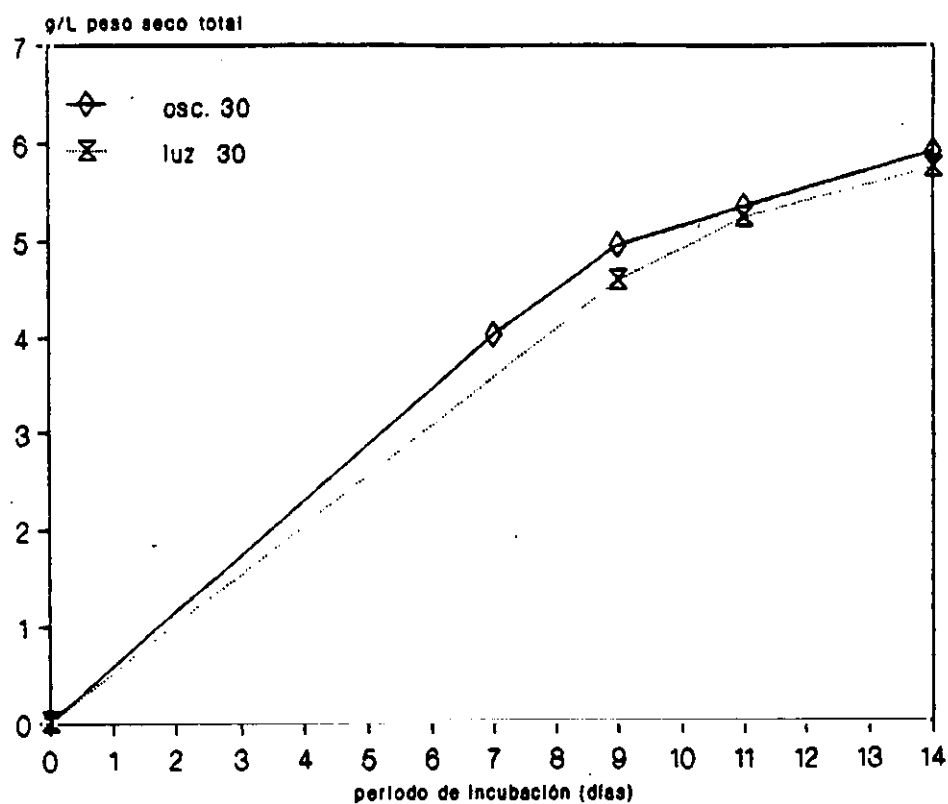
Gráfica núm. 12.- Determinación del peso seco total en presencia (luz) o ausencia de luz (osc.) a lo largo de catorce días de cultivo, cuando la concentración inicial de glucosa es de 5 g/l.



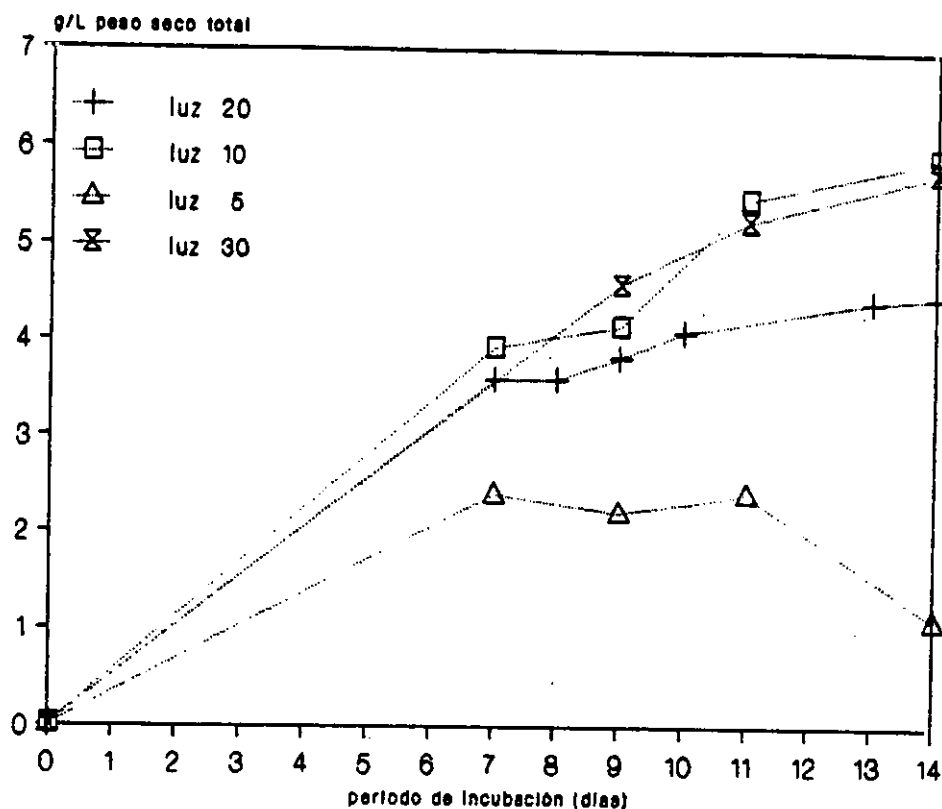
Gráfica núm. 13.- Determinación del peso seco total en presencia (luz) o ausencia de luz (osc.) a lo largo de catorce días de cultivo, cuando la concentración inicial de glucosa es de 10 g/l.



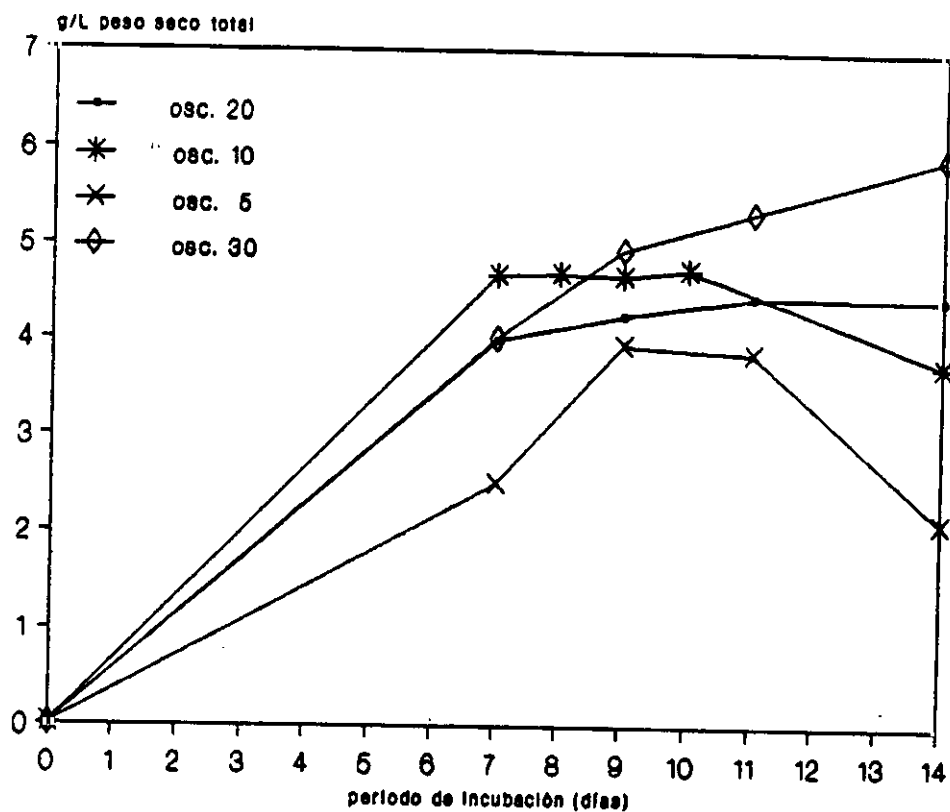
Gráfica núm. 14.- Determinación del peso seco total en presencia (luz) o ausencia de luz (osc.) a lo largo de catorce días de cultivo, cuando la concentración inicial de glucosa es de 20 g/l.



Gráfica núm. 15.- Determinación del peso seco total en presencia (luz) o ausencia de luz (osc.) a lo largo de catorce días de cultivo, cuando la concentración inicial de glucosa es de 30 g/l.



Gráfica núm. 16.- Comparación de los pesos secos totales a lo largo de los catorce días de cultivo en presencia de luz (luz), en función de la concentración de glucosa inicial.



Gráfica núm. 17.- Comparación de los pesos secos totales a lo largo de los catorce días de cultivo en ausencia de luz (osc.), en función de la concentración de glucosa inicial.

Otro parámetro analizado ha sido el relativo al consumo de glucosa a lo largo de los catorce días de desarrollo de las cepas en las condiciones mediales señaladas en el apartado correspondiente a Material y Métodos.

Se indican separadamente los resultados relativos a los cultivos realizados en presencia o en ausencia de luz.

La concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo fue de:

5, 10, 20 o 30 g/l

Los resultados se expresan en forma de Diagramas de barras y en Gráfica para una mejor visualización e interpretación de los mismos.

El Diagrama número 1 y la Gráfica número 18 corresponden a las determinaciones realizadas en cultivos en presencia de luz.

El Diagrama número 2 y la Gráfica número 19 corresponden a las determinaciones realizadas en cultivos en ausencia de luz.

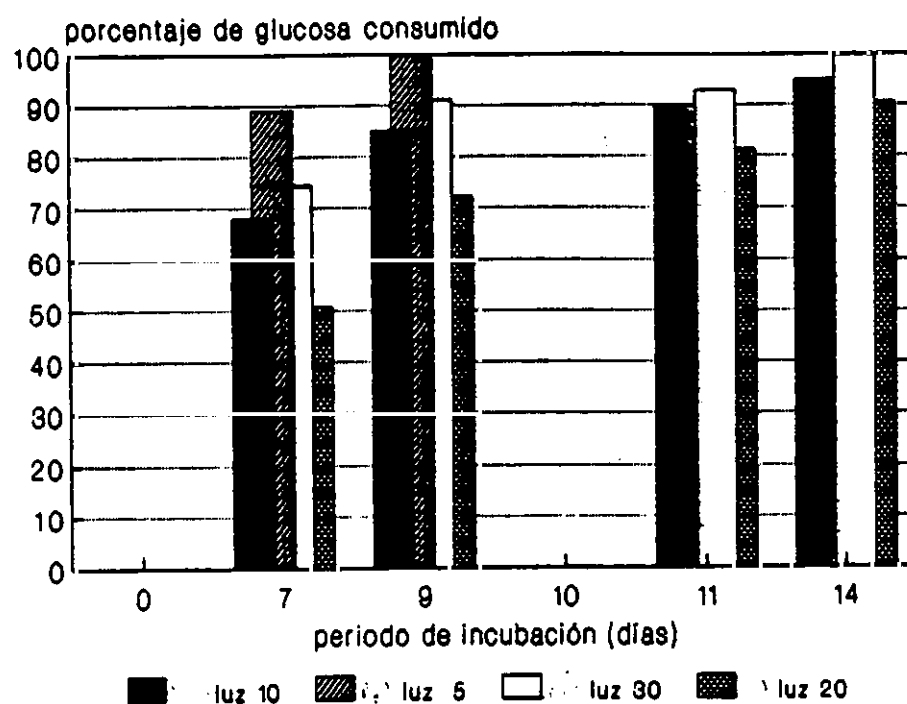
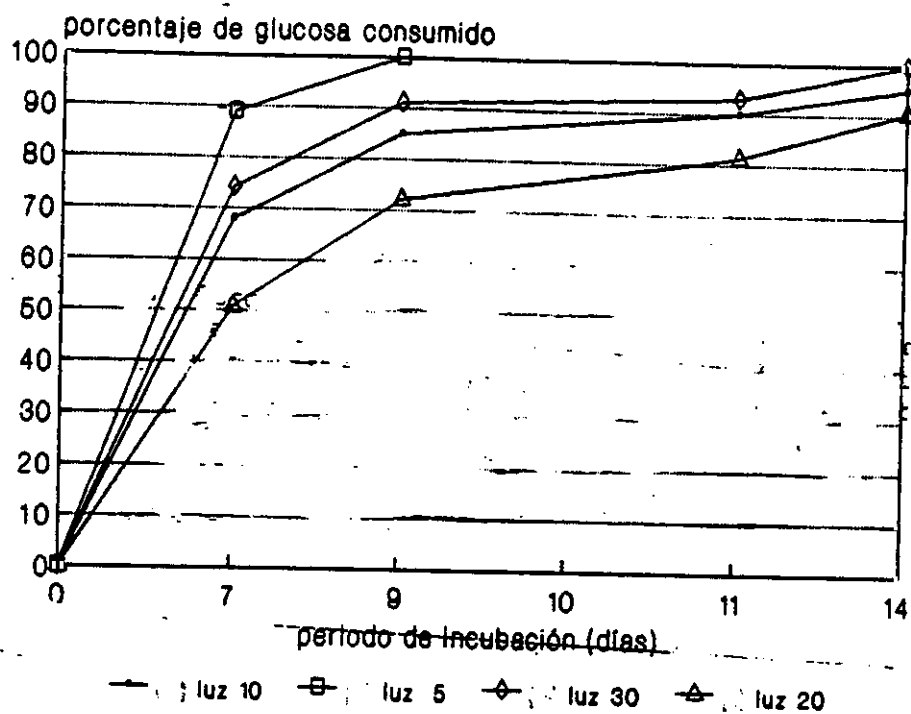


Diagrama núm. 1.- Porcentaje de glucosa consumido a lo largo de catorce días de cultivo en presencia de luz. Los valores iniciales de glucosa adicionados al medio fueron, 5, 10, 20 o 30g/l.



Gráfica núm. 18.- Porcentaje de glucosa consumido a lo largo de catorce días de cultivo en presencia de luz. Los valores iniciales de glucosa adicionados al medio fueron, 5, 10, 20 o 30g/l.

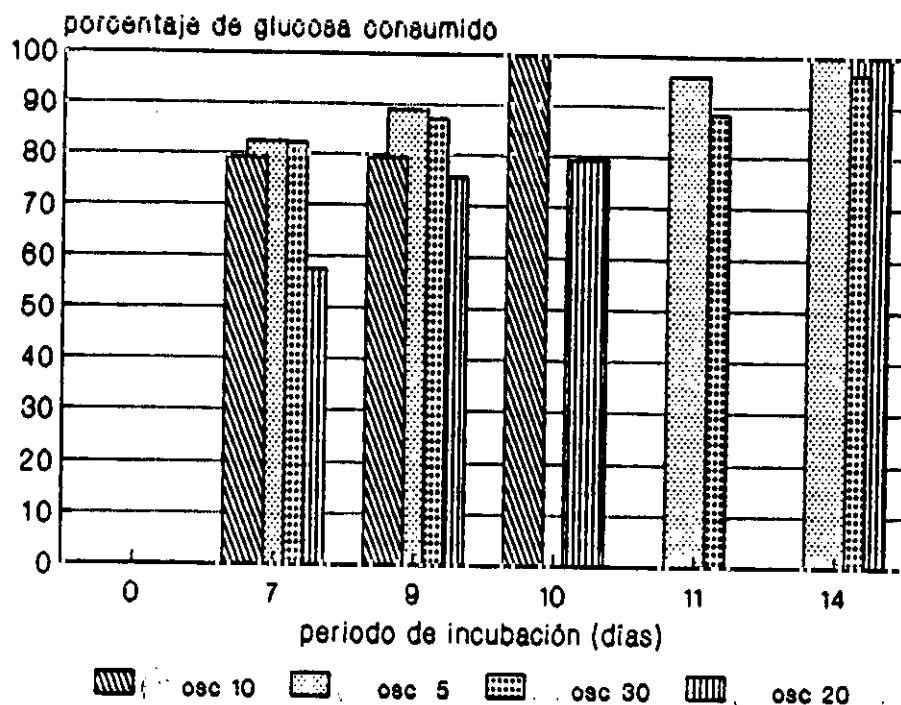
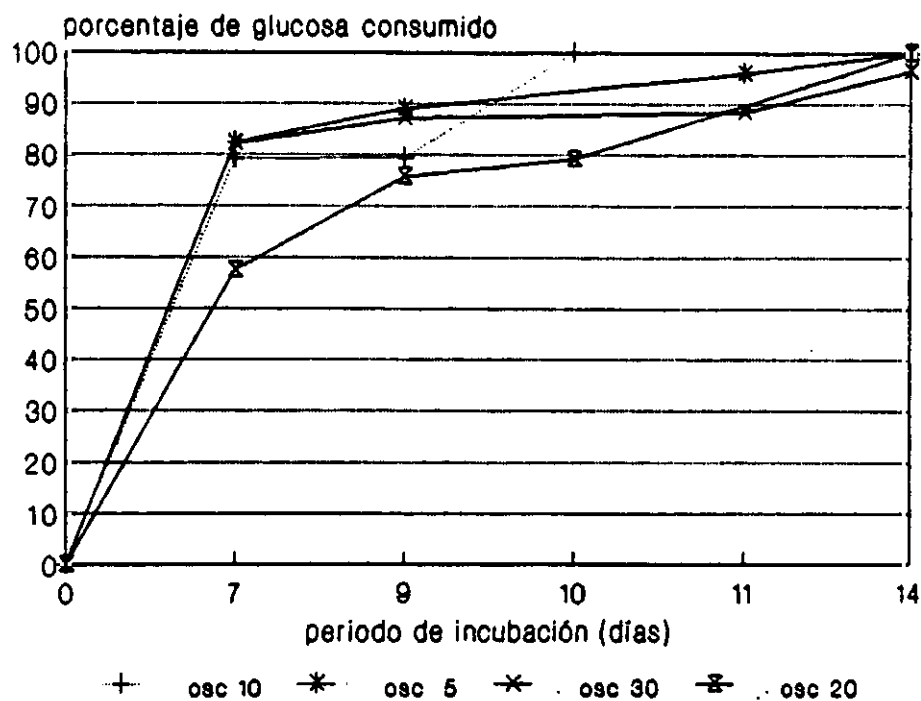


Diagrama núm. 2.- Porcentaje de glucosa consumido a lo largo de catorce días de cultivo en ausencia de luz (osc.). Los valores iniciales de glucosa adicionados al medio fueron, 5, 10, 20 o 30g/l.



Gráfica núm. 19.- Porcentaje de glucosa consumido a lo largo de catorce días de cultivo en ausencia de luz (osc.). Los valores iniciales de glucosa adicionados al medio fueron, 5, 10, 20 o 30g/l.

Cuando se realizaron las determinaciones a partir de medios de cultivos en los que inicialmente la concentración de glucosa fue de 10 g/l o de 20g/l valores habituales en la mayoría de los medios de cultivo utilizados tradicionalmente en Micología, se establecieron los parámetros relativos a:

- Coeficiente de economía del proceso.

- Coeficiente específico del crecimiento.

Los valores se resumen en la Tabla número 26.

Glucosa inicial	Luz	μ	Coef. economía
10 g/l	+	0.0306	12.00%
10g/l	-	0.0397	47.50%
20g/l	+	0.0384	23.55%
20g/l	-	0.0377	23.06%

Tabla núm. 26.- Resultados correspondientes a los coeficientes de economía y específico del crecimiento en presencia de 10 o 20 g/l de glucosa.

μ = coeficiente específico del crecimiento.

+

 = Presencia de luz.

-

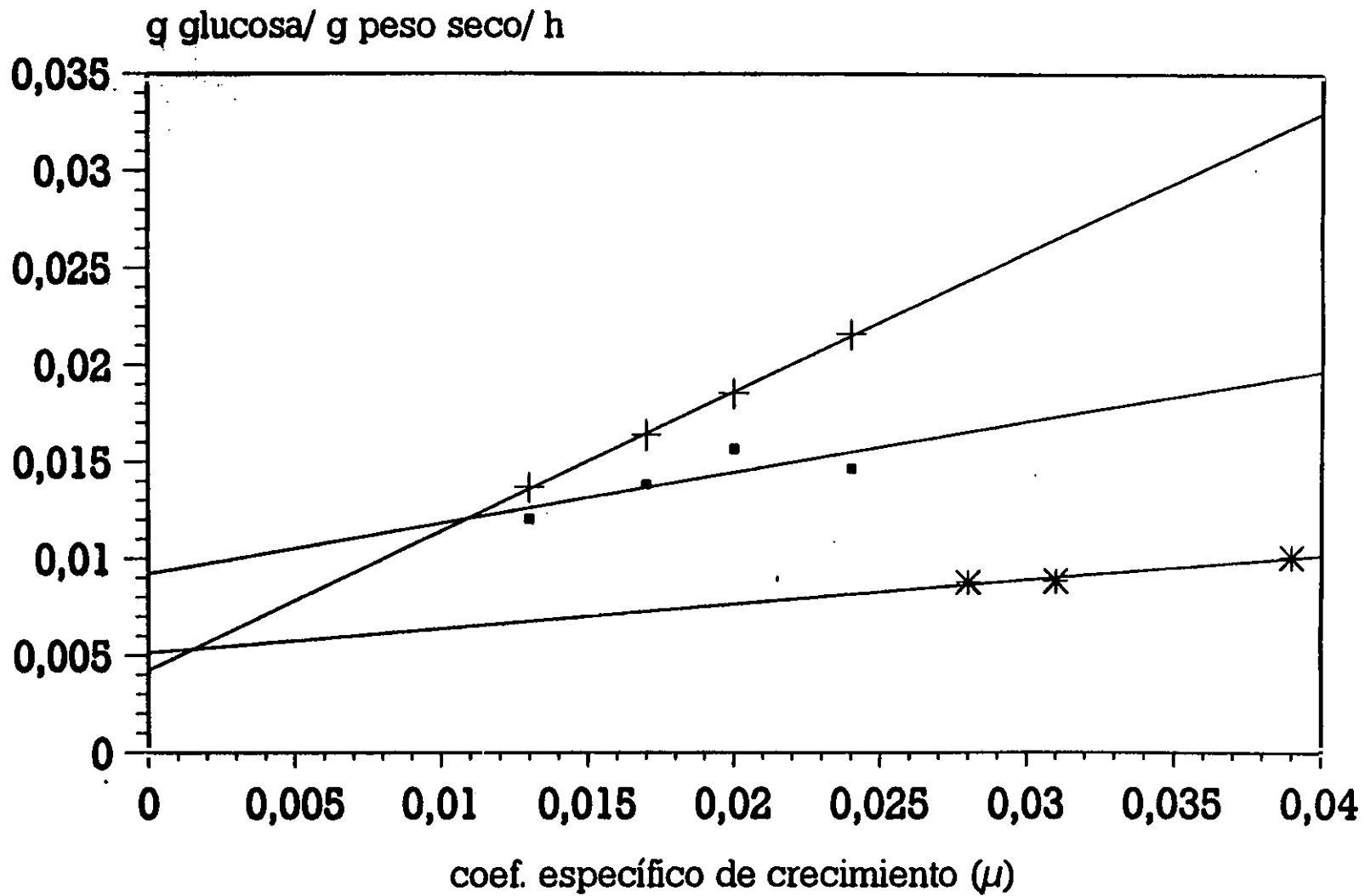
 = Ausencia de luz.

En la Gráfica número 20 se aporta la relación entre el coeficiente específico de crecimiento y el coeficiente específico de utilización de la glucosa.

La intersección con la ordenada nos permite deducir el requerimiento de mantenimiento en glucosa.

Los valores corresponden a los estudios realizados con una concentración de glucosa de 20g/l que corresponde a la concentración de esta fuente de carbono en el medio de extracto de malta al 2%, medio de cultivo considerado de elección para llevar a cabo estos estudios, según los análisis previos realizados por Larrondo en 1989 y Agut en 1992.

Gráfica núm. 20.- Relación entre el coeficiente específico de crecimiento y el coeficiente específico de utilización de la glucosa.



En las pruebas realizadas en presencia y ausencia de luz a lo largo de catorce días se han establecido los parámetros que se resumen en la Tabla número 27, en la que se señala:

- Periodo de incubación en días.
- Peso seco en g/l.
- Relación entre g/l glucosa consumidos por hora y g/l de cultivo (peso seco) por hora (R).
- Coeficiente específico de crecimiento (μ).
- Porcentaje de glucosa consumida.

ENSAYO	DIAS	PESO SECO g/l	R	μ	%GLUCOSA CONSUMIDA
<hr/>					
1	7	4.000	0.01466	0.02377	50.735
1	9	4.266	0.01567	0.01972	72.220
1	11	4.459	0.01382	0.01686	81.345
1	14	4.452	0.01207	0.01325	90.310
<hr/>					
2	7	3.595	0.01901	0.02136	57.45
2	9	3.836	0.01825	0.01773	75.61
2	11	4.096	0.01611	0.01704	79.17
2	14	4.473	0.01331	0.01329	100.00

Tabla núm. 27.- Parámetros obtenidos en los ensayos realizados, adicionando glucosa a la concentración de 20g/l.
 Ensayo 1: Presencia de luz.
 Ensayo 2: Ausencia de luz.

En la Tabla número 28, se resumen los resultados correspondientes a porcentajes de inhibición frente a diversos microorganismos, atendiendo al día de máxima actividad inhibidora en las condiciones de cultivo siguientes.

- Prueba 1: 20g/l de glucosa. Presencia de luz.
- Prueba 2: 20g/l de glucosa. Ausencia de luz.
- Prueba 3: 10g/l de glucosa. Ausencia de luz.

MICROORGANISMO	PRUEBA	% MAX. INHIBICION	DIA MAX. ACTIVIDAD

<u>S. aureus</u>	1	45.00%	8
	2	53.10%	10
	3	25.27%	14

<u>B. cereus</u>	1	15.57%	14
	2	83.15%	13
	3	28.57%	8

<u>S. faecalis</u>	1	45.37%	9
	2	42.86%	9
	3	39.41%	14

<u>P. aeruginosa</u>	1	81.24%	7
	2	97.92%	13
	3	15.60%	14

<u>E. coli</u>	1	23.40%	11
	2	24.91%	14
	3	4.72%	13

<u>C. albicans</u>	1	31.71%	7
	2	93.53%	14
	3	83.22%	8

Tabla núm. 28.- Resultados obtenidos relacionando el porcentaje máximo de inhibición, el día de máxima actividad y las condiciones de cultivo consideradas.

5. D I S C U S I O N

5. D I S C U S I O N

5.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.

5.1.1. Ensayos frente a bacterias y levaduras.

Los resultados correspondientes a este apartado se resumen en la Tabla número 3.

El comentario de los resultados de inhibición obtenidos lo realizaremos separadamente para cada uno de los siete microorganismos ensayados.

Bacillus cereus

El porcentaje de cepas del género Arthrini activas al ensayar el extracto crudo, sobre Bacillus cereus es del orden del 34%.

El porcentaje máximo de lisis (100%) de este microorganismo frente a los extractos ensayados, se obtuvo cuando las cepas del género Arthrini pertenecían a las especies:

A. phaeospermum (A23 y A24)

A. urticae (A45)

A partir de tres de los extractos correspondientes a las cepas A13 (A. hispanicus), A22 (A. mediterranii) y A29 (A. puccinoides) se obtuvo un 0.0% de lisis, indicando este valor que el crecimiento de B. cereus fue el mismo en los ensayos con o sin adición del extracto crudo.

En los ensayos realizados a partir de veintisiete de los extractos, éstos no sólo no fueron inhibidores del crecimiento sino que incluso se obtuvieron valores de desarrollo de B. cereus superiores a los relativos a los ensayos control.

El resto de los extractos determinó valores de inhibición de la cepa de B. cereus que oscilaron desde un 3.15% hasta un 91.24%.

Staphylococcus aureus

El 50% de los extractos obtenidos de las cepas ensayadas fueron activos sobre este microorganismo.

Los valores máximos de actividad se han obtenido a partir de los extractos de la cepa A25 que corresponde a A. phaeospermum, con el que se obtuvo un porcentaje de inhibición del orden del 84.54%. Dos cepas, determinaron una inhibición del orden del 66%, correspondiendo a A. hispanicus (A13) y A. phaeospermum (A23).

Tan sólo en el caso de la cepa A42 (A. urticae) el desarrollo de S. aureus fue el mismo en presencia que en ausencia del extracto.

Veintidos de los extractos analizados determinaron en contacto con el microorganismo de ensayo un incremento en su desarrollo al comparar éste con el obtenido en el control.

Escherichia coli

Trece de los extractos obtenidos de las cepas del género Arthrinium ensayadas fueron activos, aunque el porcentaje de inhibición no fue en ningún caso superior al 14.5%, e incluso en algunas ocasiones la adición del extracto crudo procedente de las cepas de Arthrinium favorecía el desarrollo del microorganismo en estudio.

La cepa más activa frente a E. coli ha sido la A29 (A. puccinoides) cuyo extracto determinó una inhibición del orden del 78%.

Treinta y tres de los extractos de las cepas ensayadas determinaron un mayor desarrollo del microorganismo en estudio frente al ensayo control.

Streptococcus faecalis

El microorganismo más sensible a los extractos crudos ensayados ha sido Streptococcus faecalis dado que un 58.69% de las cepas de Arthrinium fueron activas, aunque el porcentaje de lisis del microorganismo no superó en ningún caso el 22%.

Tres de los extractos determinaron un desarrollo de Streptococcus faecalis del mismo orden que el obtenido en el ensayo control. Estos extractos correspondían a las cepas:

A20 (A. marii)

A21 (A. mediterranii)

A40 (A. serenensis).

El máximo valor de inhibición fue en este caso del orden del 21.47% y fue obtenido a partir del ensayo con el extracto obtenido de la cepa A6 correspondiente a A. arundinis.

Enterobacter cloacae

Frente a Enterobacter cloacae, un 43.47% de las cepas de Arthrrium fueron activas, observándose en algunas cepas capacidad de inhibición superiores al 90%.

Destacaremos que los máximos valores de inhibición (100%) fueron desarrollados por los extractos de tres cepas:

A 6 (A. arundinis)

A29 (A. puccinoides)

A45 (A. urticae).

Otros resultados de inhibición notables fueron los correspondientes a las cepas siguientes:

A13 (A. hispanicus) : 90.58%

A21 (A. mediterranii): 93.90%

A25 (A. phaeospermum): 82.57%

Sólo a partir de un extracto se observó un desarrollo igual en presencia que en ausencia del mismo, y éste correspondía a la cepa A41 (A. serenensis).

Finalmente destacaremos que veinticinco extractos actuaron como un factor de desarrollo para el microorganismo en estudio, dado que su adición al medio de cultivo favoreció el crecimiento de Enterobacter cloacae.

Pseudomonas aeruginosa

Sobre este microorganismo un cincuenta por ciento de los extractos ensayados fueron activos.

Los máximos porcentajes de lisis detectados fueron desencadenados a partir de los extractos de las cepas siguientes:

A 7 (<u>A. arundinis</u>)	: 92.45%
A15 (<u>A. javii</u>)	: 90.72%
A19 (<u>A. marii</u>)	: 89.72%
A27 (<u>A. phaeospermum</u>)	: 93.11%
A37 (<u>A. saccharicola</u>)	: 92.84%
A40 (<u>A. serenensis</u>)	: 94.43%
A46 (<u>A. urticae</u>)	: 89.90%

Los extractos procedentes de cuatro cepas del género en estudio, determinaron un desarrollo de Pseudomonas aeruginosa no diferenciable cuantitativamente del obtenido en el ensayo control. Estas cepas corresponden a las especies siguientes:

A13: <u>A. hispanicus</u>
A23: <u>A. phaeospermum</u>
A28: <u>A. philippi</u>
A30: <u>A. puccinoides</u>

Finalmente podemos señalar que el extracto procedente de la cepa A46 (A. urticae) sólo presentó actividad frente a este microorganismo, entre los siete ensayados.

Candida albicans

Sobre Candida albicans fueron activas veintisiete de las cepas del género Arthrinium ensayadas, llegándose a detectar un porcentaje de inhibición del orden del 100% que correspondía al extracto de la cepa A23 correspondiente a A. phaeospermum.

En orden de importancia de actividad inhibidora los extractos que deberían mencionarse después del relativo al A23 por ser de actividad superior al 70% son los siguientes:

A 1 (<u>A. aureum</u>):	70.04%
A 8 (<u>A. arundinis</u>):	76.95%
A16 (<u>A. marii</u>):	73.58%
A36 (<u>A. saccharicola</u>):	71.42%
A40 (<u>A. serenensis</u>):	74.19%
A43 (<u>A. urticae</u>):	72.58%

Tres de las cepas determinaron que la adición de sus extractos a Candida albicans no modificara cuantitativamente su desarrollo al compararlo con el ensayo control. Estas cepas correspondían a las especies siguientes:

- A22: A. mediterranii
- A31: A. puccinoides
- A35: A. saccharicola

Quince de los extractos ensayados determinaron un incremento en el desarrollo de Candida albicans, por lo que actuaron como factores de crecimiento al ser añadidos al medio de cultivo base.

Si comparamos los resultados obtenidos a partir de los extractos con los aportados por Agut, en 1992, en el estudio realizado sobre las mismas cepas del género Arthrinium pero a partir del cultivo en medio sólido podemos indicar que en general se detecta una mayor actividad de las cepas del género Arthrinium sobre bacterias y levaduras a partir de los extractos que al ensayar el cultivo en medio sólido.

5.1.2. Discusión de los resultados relativos al volumen mínimo de extracto crudo que inhibe el desarrollo de las bacterias y de la levadura ensayadas.

Para el desarrollo de esta prueba se utilizó una modificación del método descrito por Booth, 1971 para el estudio de la capacidad inhibidora de los extractos fúngicos en medio de cultivo líquido.

Los resultados relativos a este apartado se resumen en la Tabla número 4.

La máxima cantidad de extracto crudo adicionada al medio de cultivo base fue de 2 ml, que corresponde a una concentración final de 181.8 $\mu\text{l/ml}$. Si esta concentración no era capaz de inhibir el desarrollo de los microorganismos ensayados, se indica en la Tabla como >2.

Para una mejor interpretación de los resultados obtenidos, comentaremos separadamente los relativos a cada microorganismo.

Bacillus cereus

Los extractos crudos obtenidos a partir de veintidos de las cepas del género Arthrinium en estudio, no inhibieron el desarrollo de este microorganismo al adicionarse una concentración final de extracto crudo del orden de 181.8 $\mu\text{l/ml}$.

Las cepas más activas frente a Bacillus cereus y que presentaron una CMI del orden de 72 μ l/ml fueron:

A23 (A. phaeospermum)

A24 (A. phaeospermum)

A45 (A. urticae)

Estos resultados concuerdan con los aportados en el apartado anterior, dado que estas tres cepas fueron las únicas que determinaron una inhibición del 100% sobre Bacillus cereus.

Staphylococcus aureus

En un 24% de las cepas ensayadas no fue posible establecer la concentración mínima del extracto crudo capaz de inhibir el desarrollo de S. aureus, en las condiciones de nuestro ensayo.

En todos los casos, debe señalarse que la CMI obtenida es elevada, siendo los valores mínimos detectados de 126 μ l/ml, relativos a los extractos crudos de las cepas:

A25 (A. phaeospermum)

A29 (A. puccinoides)

A30 (A. puccinoides)

La cepa A25, había sido detectada como la más activa en el estudio anterior, no así por lo que a las cepas A29 y A30 se refiere, que presentaron una baja o nula actividad inhibidora respectivamente frente a este microorganismo.

Escherichia coli

Un 17.40% de los extractos crudos procedentes de las cepas ensayadas presentaron una CMI frente a Escherichia coli superior a 181 $\mu\text{l/ml}$.

La cepa más activa frente a este microorganismo fue A40 que corresponde a la especie A. serenensis y que presentó una CMI del orden de 126 $\mu\text{l/ml}$. La mayor parte de las cepas activas precisan de una CMI de sus extractos del orden de 142 $\mu\text{l/ml}$.

Streptococcus faecalis

Diecisiete de los extractos procedentes de las cepas del género Arthrinium en estudio presentaron un valor de CMI superior al máximo detectado en este estudio.

La mayoría de los extractos presentaron una CMI del orden de 158 $\mu\text{l/ml}$, siendo el extracto más activo el obtenido a partir de la cepa A33 correspondiente a A. puccinoides cuya CMI no superó los 142 $\mu\text{l/ml}$.

Enterobacter cloacae

Un 24% de los extractos crudos ensayados presentaron una CMI superior a los 181 $\mu\text{l/ml}$.

A partir de los extractos obtenidos de las cepas A29 (A. puccinoides) y A45 (A. urticae) se detectaron los máximos de actividad dado que la CMI era en ambos casos de 72 $\mu\text{l/ml}$. El siguiente valor de CMI que debemos destacar es el relativo a la cepa A21 (A. mediterranii) que fue del orden de 100 $\mu\text{l/ml}$.

Pseudomonas aeruginosa

Frente a este microorganismo catorce de los extractos ensayados presentaron un valor de CMI de 181 $\mu\text{l/ml}$ y tan sólo seis superaron el valor considerado como límite en la metodología empleada en nuestro estudio.

El valor más óptimo de CMI obtenido corresponde a la cepa A37 (A. saccharicola) y fue del orden de 72 $\mu\text{l/ml}$.

La concentración mínima inhibitoria mayoritariamente determinada entre los extractos crudos frente a este microorganismo corresponde a 158 $\mu\text{l/ml}$.

Candida albicans

De los cuarenta y seis extractos ensayados un 19.56% de los mismos presentaron una CMI superior a 181 $\mu\text{l/ml}$.

El valor inferior obtenido frente a Candida albicans corresponde a la cepa A13 (A. hispanicus), para cuyo extracto se determinó una CMI del orden de 32 $\mu\text{l/ml}$. En orden de actividad el segundo extracto activo corresponde a la cepa A23 (A. phaeospermum) con una CMI de 100 $\mu\text{l/ml}$.

A partir de veintiocho de los extractos analizados se determinó que su concentración mínima inhibitoria era del orden de 126 $\mu\text{l/ml}$.

La actividad detectada a lo largo de este estudio no coincide con los datos aportados por Traxler y cols., 1977, 1980, dado que estos investigadores señalan tan sólo que los metabolitos elaborados por cepas del género Arthrinium (= Papularia) son sólo activos sobre levaduras, manifestando que son inactivos sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Tradicionalmente se ha venido considerando que la actividad de las cepas actualmente integradas en el género Arthrinium se manifiesta sólo en la obtención de protoplastos a partir de levaduras, señalándose la escasa o nula actividad sobre otros microorganismos, como consecuencia de la actividad de estos metabolitos sobre la síntesis del 1-3- β -d-glucano, constituyente de la pared varios microorganismos, entre los que destacan las levaduras y fundamentalmente Candida albicans, como indican Pérez y cols., 1981 y Varona y cols., 1983.

En los datos aportados a lo largo de nuestra investigación queda claramente de manifiesto la marcada actividad que sobre bacterias y asimismo sobre Candida albicans poseen las cepas investigadas.

Si bien los valores correspondientes a la concentración mínima inhibitoria aportados por Traxler y cols., 1977 para las diversas Papulacandinas purificadas, son inferiores a los determinados a lo largo de nuestro estudio, debe considerarse que en esta primera fase nuestros datos corresponden al extracto crudo sin purificación alguna, por lo que incluso en este nivel de la investigación las cepas que hemos analizado poseen actividad antibiótica mucho más evidente que la detectada por los investigadores citados.

Nuestros resultados coinciden parcialmente con los aportados por Larrondo, 1989 y por Agut, 1992, por lo que a espectro de actividad antibacteriana y antifúngica se refiere.

5.1.3. Ensayos frente a hongos filamentosos.

En la Tabla número 5 se expresan los resultados correspondientes a la actividad inhibidora de los extractos crudos procedentes de los cultivos del género Arthrinium, al enfrentarlos a Penicillium corylophilum después de veinticuatro horas de incubación.

Al analizar los resultados obtenidos, podemos destacar que sólo una cepa de Arthrinium, (A14) e identificada como A. hispanicus determinó la inhibición total de la germinación, detectándose a partir de cuatro de ellas una marcada capacidad inhibitoria de la germinación en Penicillium que se cifró en el 88.88%. Las cepas que mostraron esta actividad fueron:

A 5 (A. aureum)

A11 (A. francii)

A34 (A. saccharicola)

A35 (A. saccharicola)

En cuanto a la capacidad de inhibición de la formación del micelio podemos indicar que en veintiocho de las cepas ensayadas del género Arthrinium pudo detectarse una marcada acción inhibidora de la formación del micelio en Penicillium corylophilum al comparar los resultados obtenidos con los correspondientes a los ensayos control.

La ausencia de cadenas conidiales sólo fue detectada en un caso, que correspondía al extracto crudo de la celda A14 (A. hispanicus).

En la Tabla número 6 se expresan los resultados cuando el periodo de incubación del ensayo fue de 48 horas.

Destacaremos de ella que sólo cinco de los extractos ensayados determinaron inhibición de la germinación sobre Penicillium corylophilum, estos extractos fueron obtenidos a partir de las cepas siguientes:

- A 4 (A. aureum): 30% de inhibición.
- A10 (A. arundinis): 100% de inhibición.
- A12 (A. georgii): 20% de inhibición.
- A29 (A. puccinoides): 40% de inhibición.
- A36 (A. saccharicola): 80% de inhibición.

Finalmente señalaremos que al comparar con el ensayo control, observamos una inhibición de la formación del micelio al ensayar los extractos crudos procedentes de trece de las cepas de Arthrrium y una inhibición de la formación de cadenas conidiales al ensayar los extractos procedentes de dieciseis cepas. Los extractos que determinaron simultáneamente una inhibición de la formación del micelio y de las cadenas conidiales fueron:

- A 4 (A. aureum)
 - A 8 (A. arundinis)
 - A10 (A. arundinis)
 - A29 (A. puccinoides)
 - A31 (A. puccinoides)
 - A32 (A. puccinoides)
 - A34 (A. saccharicola)
 - A35 (A. saccharicola)
 - A36 (A. saccharicola)
-

La Tabla número 7 nos muestra los resultados obtenidos después de veinticuatro horas de incubación cuando el hongo que enfrentamos a los extractos crudos obtenidos de las cepas del género Arthrinium es Aspergillus niger.

Debemos destacar que se obtuvo una germinación de Aspergillus niger mayor en los ensayos problema que en los control al ensayar el extracto crudo obtenido de diecisiete de las cepas de Arthrinium estudiadas.

En cuanto a la inhibición de la formación de micelio podemos destacar que un 23.9% de las cepas de Arthrinium presentaron esta característica al enfrentarlas a este hongo filamentoso y sólo dos de las cepas fueron capaces de inhibir la formación de cabezas conidiales.

En la Tabla número 8 se expresan los resultados correspondientes a los ensayos cuando el período de incubación era de cuarenta y ocho horas.

Podemos señalar que un 80.43% de las cepas de Arthrinium inhibieron la formación de micelio en Aspergillus niger, al ensayar el extracto crudo y un 52.17% de las cepas inhibieron la formación de cabezas conidiales.

En la Tabla número 9 se resumen los resultados correspondientes a la actividad inhibidora de los extractos crudos obtenidos a partir de las cepas del género Arthrinium sobre Aspergillus flavus, después de 24 horas de incubación.

Un 50% de las cepas de Arthrinium produjeron una inhibición de la formación de micelio de Aspergillus flavus y un 30.43% de las cepas inhibieron la formación de cabezas conidiales.

En la Tabla número 10 los resultados expresados corresponden a los obtenidos sobre Aspergillus flavus pero en este caso después de cuarenta y ocho horas de incubación.

En un 60.86% de las cepas del género Arthrinium se observó inhibición de la formación del micelio del hongo y en un 65% de las cepas inhibición de la formación de cabezas conidiales.

En la Tabla número 11 se expresan los resultados correspondientes a la capacidad inhibidora de los extractos crudos procedentes de las cepas del género Arthrinium sobre Aspergillus fumigatus después de veinticuatro horas de incubación.

Atendiendo a las otras dos características observadas en este estudio mencionaremos que un 58.69% de las cepas de Arthrinium ensayadas inhibieron la formación del micelio de Aspergillus fumigatus y un 28.26% de las cepas inhibieron también la formación de cabezas conidiales.

La Tabla número 12 expresa los resultados obtenidos sobre Aspergillus fumigatus después de cuarenta y ocho horas de incubación.

Destacaremos que después de cuarenta y ocho horas de incubación un 80.43% de las cepas inhibieron la formación de micelio de Aspergillus fumigatus y un 65.21% inhibieron la formación de cabezas conidiales.

5.1.4. Discusión de los resultados obtenidos en la detección de la actividad letal de los extractos crudos sobre larvas de Artemia salina.

En la Tabla número 13 se indican los resultados obtenidos al estudiar los porcentajes de letalidad en larvas de Artemia salina producida por los extractos de las cepas de Arthrinium transcurridas 4h 30' y 7h 30' de contacto.

Se observan asimismo diferencias en los valores de mortalidad según se ensayan 0.1 ml o 0.2 ml del extracto.

Los resultados obtenidos frente a estas larvas, demuestran que en la mayoría de los casos los extractos son activos frente a estos organismos, con lo que se demuestra la actividad de los extractos crudos sobre las células eucariotas.

Transcurridas 4h 30' de incubación cuando se añadieron 0.1 ml del extracto crudo, podemos destacar que sólo son activas dos cepas del género Arthrinium:

A17 (A. marii): 2% de mortalidad.

A28 (A. philippi): 30% de mortalidad.

Cuando se adicionan 0.2 ml del extracto crudo al medio que contienen las larvas de Artemia salina aumenta el número de cepas activas, que alcanza la cifra de seis:

A 9 (A. arundinis): 22% de mortalidad.

A17 (A. marii): 90% de mortalidad.

A21 (A. mediterranii): 10% de mortalidad.

A22 (A. mediterranii): 100% de mortalidad.

A28 (A. philippi): 30% de mortalidad.

A46 (A. urticae): 17% de mortalidad.

Transcurridas 7h 30' después de adicionar 0.1 ml de los extractos procedentes de las cepas del género Arthrinium, se observa que los resultados coinciden totalmente con los obtenidos tras un periodo de incubación de 4h 30'. Sin embargo, después de adicionar 0.2 ml del extracto, aumentan los porcentajes de letalidad respecto a la lectura anterior. En este caso han sido once las cepas del género Arthrinium activas y son las siguientes:

A 4	(<u>A. aureum</u>):	100% de mortalidad.
A 9	(<u>A. arundinis</u>):	22% de mortalidad.
A17	(<u>A. marii</u>):	100% de mortalidad.
A21	(<u>A. mediterranii</u>):	10% de mortalidad.
A22	(<u>A. mediterranii</u>):	100% de mortalidad.
A24	(<u>A. phaeospermum</u>):	20% de mortalidad.
A28	(<u>A. philippi</u>):	30% de mortalidad.
A30	(<u>A. puccinoides</u>):	100% de mortalidad.
A35	(<u>A. saccharicola</u>):	20% de mortalidad.
A36	(<u>A. saccharicola</u>):	50% de mortalidad.
A46	(<u>A. urticae</u>):	17% de mortalidad.

En la Tabla número 14, se resumen los resultados correspondientes a las 9h 30' y 24h de incubación.

A las 9h 30' de contacto entre las larvas y los extractos, destacaremos que al añadir 0.1 ml al medio de cultivo se detectaron un 26% de extractos activos. Tres de las cepas determinaron un 100% de mortalidad de las larvas. Estas cepas fueron:

A17 (A. marii)

A33 (A. puccinoides)

A43 (A. urticae)

Al ensayar 0.2 ml del extracto crudo, se observó que veintiocho de las cepas del género Arthrinium presentaron actividad, debiendo destacar que doce, determinaron una mortalidad del 100 % de las larvas de Artemia salina. Estas doce cepas fueron las siguientes:

A 4 (A. aureum)
A 9 (A. arundinis)
A15 (A. arundinis)
A17 (A. marii)
A18 (A. marii)
A22 (A. mediterranii)
A27 (A. phaeospermum)
A28 (A. philippi)
A29 (A. puccinoides)
A30 (A. puccinoides)
A38 (A. saccharicola)
A43 (A. urticae)

Finalmente, cuando el período de incubación en presencia del extracto fue de 24 horas, se observó que la adición de 0.1 ml de extracto crudo, puso de manifiesto que el 82.6% de las cepas en estudio eran activas frente a las larvas, variando los porcentajes de mortalidad desde un 10%, en el caso de las cepas A11 (A. francii), A39 (A. serenensis) y A41 (A. serenensis) hasta el 100% ocasionado por los extractos de dieciseis de las cepas ensayadas.

Si se adicionan 0.2 ml, todas las cepas son activas excepto dos que corresponden a:

A 7 (A. arundinis)
A25 (A. phaeospermum)

A partir de treinta y seis de los extractos se alcanzó un 100% de mortalidad de las larvas.

Las larvas de Artemia salina fueron, sensibles a la acción de los extractos obtenidos de las cepas en estudio, coincidiendo este hecho con los datos de sensibilidad aportados por Guarro, 1978 y Harwing y Scott, 1971, y pudiendo señalar que la actividad se empieza a detectar a las 4h30' de iniciado el ensayo, por lo que los primeros datos de actuación de las micotoxinas pueden obtenerse rápidamente. En ningún caso los ensayos control determinaron mortalidad alguna en las larvas.

5.1.5. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio bajo microscopio electrónico de las variaciones morfológicas producidas por extractos de cepas del género Arthrinium.

La visualización bajo el microscopio electrónico de las modificaciones o alteraciones morfológicas desencadenadas por el contacto con extractos procedentes de labiadas, ha sido citada por Larrondo y Calvo, 1992.

Los resultados obtenidos, en nuestro estudio, nos indican que los extractos crudos de las cepas del género Arthrinium poseen una actividad no sólo sobre la viabilidad de las cepas sino que también determinan modificaciones en la morfología de las bacterias.

La capacidad enzimática de las cepas ensayadas, demostrada en anteriores trabajos por Larrondo y Calvo, 1991 puede estar directamente relacionada con la capacidad lítica sobre las células procariotas ensayadas.

Los ensayos realizados a partir de los extractos de A. mediterranii sobre Escherichia coli y sobre Enterobacter cloacae muestran una acción sobre la morfología de las cepas bacterianas, que contrasta con el aspecto de las mismas tras el ensayo control.

En la Lámina número 1, se observa que frente a Escherichia coli el extracto puede llegar a determinar la presencia de formas aberrantes o anómalas.

En la Lámina número 2, se observa que el contacto con el extracto puede llegar a determinar la presencia de formas aberrantes de Enterobacter cloacae, así como una marcada disminución de la densidad de crecimiento.

5.1.6. Discusión de los resultados obtenidos para determinar el punto óptimo de producción de sustancias antibióticas y su relación con el crecimiento de los microorganismos en estudio.

Al analizar la curva de desarrollo que presentan las cepas del género Arthrimum, podemos deducir que existe una primera fase de crecimiento, del primero al sexto día de incubación que coincide con el máximo decremento del pH del medio de cultivo en el que se incuban las cepas. A partir del sexto día, el pH sufre un descenso muy poco acentuado pasando a estabilizarse a partir del décimo día de incubación. El crecimiento se mantiene en aumento, aunque de forma mucho más moderada que en la fase anterior, hasta llegar al día decimotercero en que nuevamente se incrementa de forma muy acentuada.

Para una mejor interpretación de los resultados, consideraremos separadamente la sensibilidad detectada en los siete microorganismos empleados en este estudio y teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el extracto completo y las fases acuosa y orgánica del mismo.

Staphylococcus aureus

Frente a los catorce extractos ensayados procedentes del cultivo de las cepas del género Arthrimum, podemos destacar que existe una inhibición desde el primer día del ensayo cuando utilizamos la técnica de los discos, impregnados con los mencionados extractos. Este resultado difiere notablemente del obtenido por la técnica espectrofotométrica, dado que mediante esta última no se observó inhibición alguna, debido a la dilución que sufría el principio activo en el medio de cultivo total.

En relación con la fase acuosa, no se detectó actividad alguna.

La fase orgánica demostró ser muy activa. Los resultados obtenidos mediante el método de los discos y el espectrofotométrico, coinciden cualitativamente, detectándose inhibición de Staphylococcus aureus ya a partir de los extractos procedentes de cultivos de veinticuatro horas de incubación. La inhibición fue creciente a lo largo de todo el estudio, como puede observarse en la Gráfica número 2.

Bacillus cereus

Al considerar los resultados obtenidos frente a este microorganismo, podemos señalar que en ninguno de los dos métodos ensayados se observó actividad por parte de los extractos crudos totales ni de las fases acuosas.

En relación con las fases orgánicas señalaremos que por el método de los discos, la actividad se observó a partir del extracto procedente de cultivos de seis días de incubación. En el método espectrofotométrico, y cuantificada la actividad inhibidora, puede apreciarse en la Gráfica número 3 que a partir del día sexto la inhibición progresa de forma creciente hasta alcanzar un valor del 42.9%, el último día del ensayo.

Streptococcus faecalis

Si consideramos los valores de inhibición por el método de los discos, observaremos que el extracto crudo total, no fue activo al igual que la fase acuosa obtenida a partir de él.

La fase orgánica, presentó actividad por los dos métodos ensayados a partir de los extractos obtenidos desde el segundo día de desarrollo de las cepas del género Arthrinium, seleccionadas en este estudio.

La representación de los valores obtenidos se aporta en la Gráfica número 4 y en ella puede observarse un marcado aumento de la inhibición a partir de los extractos de tres días de desarrollo de Arthrinium. Los valores de inhibición fueron incrementándose de forma paulatina, hasta el final del estudio.

Pseudomonas aeruginosa

Frente a Pseudomonas aeruginosa se observó por los dos métodos utilizados que tan sólo la fase acuosa carecía de actividad, dado que tanto el extracto crudo total como la fase orgánica obtenida a partir del mismo determinaba una inhibición de este microorganismo.

En el caso de los extractos crudos totales, la actividad se detectaba a partir del segundo día de incubación por medio de la técnica de los discos, sin embargo por la técnica espectrofotométrica la actividad se puso de manifiesto desde el primer día del ensayo. Por este método se detecta, como puede deducirse de la Gráfica número 5 que el porcentaje inhibición causado por el extracto crudo total sufre un marcado incremento a partir de los extractos obtenidos entre el séptimo y el octavo día de incubación de las cepas del género Arthrinium. La inhibición alcanza valores superiores al 90% a partir de los extractos obtenidos de cultivos de catorce días.

En relación con la fase orgánica del extracto, la inhibición del desarrollo de Pseudomonas aeruginosa, se observa por los dos métodos, a partir de extractos obtenidos desde el primer día de incubación de las cepas del género Arthrinium.

Por el método espectrofotométrico puede apreciarse un marcado incremento de inhibición a partir de los extractos obtenidos de cultivos de siete días.

El máximo porcentaje de inhibición se detecta a partir de extractos de catorce días de incubación, siendo en todos los casos los valores de inhibición obtenidos con la fase orgánica ligeramente superiores que los obtenidos con el extracto completo, como puede observarse en la Gráfica número 5.

Escherichia coli

Al ensayar los extractos crudos totales y la fase acuosa obtenida a partir de los mismos, no se detectó inhibición alguna de la cepa de Escherichia coli.

La fase orgánica determinó una inhibición del crecimiento del microorganismo en estudio, a partir de los extractos obtenidos tras el segundo día de desarrollo de las cepas del género Arthrinium. Entre los extractos del segundo y tercer día, se observa un incremento de actividad que alcanza su máximo valor a partir de extractos de siete días. Los extractos procedentes de cultivos de más de siete días, mantienen un porcentaje de inhibición de Escherichia coli, prácticamente constante, como puede observarse en la Gráfica número 6.

Candida albicans

Frente a Candida albicans ni los extractos crudos totales ni las fases acuosas de los mismos fueron activas.

En relación con las fases orgánicas, podemos señalar que la actividad frente a esta levadura se puso de manifiesto a partir de los extractos procedentes de cultivos de seis días. El porcentaje de inhibición presentó un importante incremento a partir de los extractos obtenidos el séptimo día de desarrollo de las cepas del género Arthrinium, alcanzándose valores de inhibición superiores al 96% a partir del contacto con extractos de catorce día de incubación.

Los resultados obtenidos se observan en la Gráfica número 7.

Aspergillus niger

Frente a Aspergillus niger sólo se realizaron ensayos por el método de los discos, ya que por tratarse de un hongo miceliar su cuantificación espectrofotométrica reviste dificultades de exactitud y repetitividad.

Mediante la técnica de los discos, sólo se detectó actividad a partir de las fases orgánicas procedentes de cultivos de Arthrinium de ocho y nueve días, observándose una pérdida de la capacidad inhibidora a partir de los extractos obtenidos de cepas de Arthrinium desarrolladas por periodos de tiempo superiores. Estos resultados coinciden con los señalados por Traxler y cols., 1977, quienes indican que al prolongarse el periodo de incubación de las cepas fúngicas puede producirse el fenómeno de la autometabolización, perdiendo en este caso la capacidad inhibidora de los mismos.

5.1.7. Discusión de los resultados correspondientes a las cromatografías en capa fina de los extractos obtenidos.

Los resultados correspondientes a este apartado se aportan en las Tablas números 16 a 19 y en ellas se aportan tan sólo los correspondientes a las cepas en las que se detectaron uno o más componentes, tras el desarrollo cromatográfico y su visualización a 254 y 365 nm.

La elección de los dos sistemas de solventes así como el realizarlo en placas con o sin indicador de fluorescencia se ha llevado a cabo con el fin de poder detectar el máximo número de componentes posible y de poder comparar nuestros resultados con los aportados por Agut, 1992 y por Traxler y cols. en 1977.

La cepa que presentó mayor diversidad de componentes al ser analizados por el sistema cloroformo: acetato de etilo: ácido acético glacial (6:3:1) en placas con indicador de fluorescencia fue la relativa a Arthrinium georgii (A12), en la que se detectaron bajo luz u.v. de 254 nm, un total de cuatro componentes a los catorce días de incubación y tres a los veintiun días de incubación, observándose que sólo se mantenía uno de los componentes ya que presnetaba en ambos casos un Rf de 0.72. Este componente fue también visualizado bajo luz u.v. de 365 nm.

En los extractos de veintiun días de la cepa A18, correspondiente a Arthrinium marii, se detectaron tres componentes de los cuales el que poseía un Rf igual a 0.72, fue también detectado a los catorce días y visualizado tanto a 254 como a 365 nm.

Este componente de Rf = 0.72, se detectó en las cepas:

A12 (A. georgii) de 14 y 21 días
A14 (A. hispanicus) de 21 días
A16 (A. marii) de 21 días
A18 (A. marii) de 14 y 21 días
A38 (A. saccharicola) de 21 días
A41 (A. serenensis) de 7 días

Un componente de Rf= 0.56 fue evidenciado en un total de cuatro cepas:

A12 (A. georgii) de 14 días
A16 (A. marii) de 21 días
A19 (A. marii) de 21 días
A38 (A. saccharicola) de 21 días

Asimismo el componente de Rf= 0.26, se detectó en tres cepas:

A12 (A. georgii) de 7 y 21 días
A18 (A. marii) de 21 días
A36 (A. saccharicola) de 21 días

Cuando las placas cromatográficas carecían de indicador, el componente fundamentalmente detectado presentaba asimismo un valor de $R_f = 0.26$ y fue observado en las cepas siguientes:

- A12 (*A. georgii*) de 14 días
- A13 (*A. hispanicus*) de 14 días
- A14 (*A. hispanicus*) de 7 y 14 días
- A21 (*A. mediterranii*) de 7 días
- A26 (*A. phaeospermum*) de 7 días
- A36 (*A. saccharicola*) de 21 días
- A37 (*A. saccharicola*) de 21 días
- A41 (*A. serenensis*) de 7 días
- A43 (*A. urticae*) de 7 días

Como puede deducirse la variabilidad de resultados obtenidos permite afirmar que para poder establecer la totalidad de componentes de un extracto deben emplearse más de un sistema de desarrollo de las placas cromatográficas así como placas con y sin indicador de fluorescencia, debiendo realizarse las lecturas bajo luz u.v. de 254 y 365 nm para poder visualizar el máximo de componentes. Sin duda la concentración de cada uno de los componentes en el extracto o en la fase orgánica objeto de investigación es un factor limitante para su detección por cromatografía.

Los resultados aportados coinciden parcialmente con los señalados por Agut, 1992, en estudios realizados a partir de cultivos de las mismas cepas del género *Arthrinium* pero sin proceder a la obtención de los extractos, en este caso las cromatografías se realizaron a partir de discos de cultivo en medio de sólido que se pusieron en contacto con las placas de desarrollo cromatográfico y posteriormente fueron analizadas en las mismas condiciones que las indicadas en nuestro estudio.

La no coincidencia en algunos de los resultados es consecuencia de la diferente metodología utilizada.

5.1.8. Discusión de los resultados obtenidos tras la realización de las bioautografías.

En este apartado del estudio se ensayó la sensibilidad de Staphylococcus aureus frente a cada una de las placas cromatográficas en las que se evidenciaron componentes o huellas cromatográficas, considerándose como positivos aquellos casos en los que tras la incubación en las condiciones señaladas en el apartado correspondiente de Material y Métodos se observaban halos de inhibición del desarrollo de Staphylococcus aureus alrededor de las huellas cromatográficas previamente detectadas.

Los resultados correspondientes a este apartado se resumen en la Tabla número 20, en la que se indican valores globales de actividad frente a S. aureus indicando separadamente los resultados relativos a cada cepa activa y en los cuatro entornos de trabajo considerados.

A partir de las bioautografías puede afirmarse la actividad inhibidora de las cepas sobre bacterias Gram positivas, hecho demostrado en capítulos precedentes y que nuevamente viene a confirmar el mayor grado de actividad antibiótica y el más amplio espectro de actividad detectado en nuestro estudio frente a los resultados aportados por Traxler y cols., 1977.

Entre las cepas con mayor actividad demostrada frente a Staphylococcus aureus mediante la técnica de la bioautografía destacaremos:

- A12 (A. georgii)
- A20 (A. marii)
- A38 (A. saccharicola)
- A41 (A. serenensis)

Estas cuatro cepas fueron activas en los cuatro sistemas de trabajo empleados para el desarrollo y visualización de las cromatografías, si bien varían en los días que debe tener el extracto para ser activo, en algunos casos.

Las cepas que manifestaron actividad inhibidora por este método como mínimo a partir de dos de los sistemas considerados fueron:

A 2 (A. aureum) Sistemas 3 y 4
A 5 (A. aureum) Sistemas 3 y 4
A 8 (A. arundinis) Sistemas 2, 3 y 4
A19 (A. marii) Sistemas 1 y 3
A21 (A. mediterranii) Sistemas 3 y 4
A26 (A. phaeospermum) Sistemas 3 y 4
A28 (A. philippi) Sistemas 3 y 4
A36 (A. saccharicola) Sistemas 2, 3 y 4

5.1.9. Discusión de los resultados obtenidos por la acción de agentes mutágenos.

- Efecto de la radiación ultravioleta.

Los resultados relativos a la supervivencia de las cepas del género Arthrinium se resumen en la Tabla número 21.

Tras el análisis de los resultados y según los datos aportados por diversos autores, Townsend y cols., 1988; Lennox y Davis, 1983 y Leaich y Papa, 1974, determinamos que el tiempo de tratamiento para proseguir los estudios debía ser de 20', ya que en este tiempo se obtenían valores de supervivencia que oscilaban entre el 1.34% para A. philippi y 4.02% para A. georgii, resultados que estar en perfecta correlación con los señalados por los autores anteriormente citados, aunque para otras especies fúngicas.

Podemos señalar que por ser Arthrinium un género constituido por hongos dematiáceos y por tanto con abundante pigmentación, sus especies se hallan fuertemente protegidas a la acción de los agentes mutágenos, como lo demuestra el hecho de que para alcanzar porcentajes de supervivencia bajos sea preciso realizar tratamientos de 20'.

En la Tabla número 22 se aportan los resultados correspondientes a la supervivencia de todas las cepas ensayadas con un período de irradiación de 20 minutos. Podemos observar que los menores índices de supervivencia corresponden a las cepas siguientes:

- A. arundinis Índice de supervivencia <1.99%
- A. hispanicus Índice de supervivencia <1.68%
- A. philippi Índice de supervivencia <1.34%
- A. serenensis Índice de supervivencia <1.90%
- A. urticae Índice de supervivencia <1.99%

La cepa que presentó el valor más elevado en los índices de supervivencia, siendo superiores a 4% fue la correspondiente a A. georgii.

Al estudiar si las cepas que presentaron alteraciones morfológicas detectables eran asimismo mutantes respecto a la producción de sustancias inhibitoras se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla número 23, en ella puede apreciarse el bajo rendimiento en la obtención de mutantes ya que tan sólo fue posible demostrar la obtención de diez mutantes morfológicas y de dos mutantes de actividad, en ambos casos coincidieron las cepas en presentar esta doble mutación.

Las especies con mayor capacidad para presentar mutaciones morfológicas fueron:

A. aureum 3 cepas

A. marii 2 cepas

Las dos cepas de las se pudo obtener una doble mutante fueron:

A 3 (A. aureum)

A16 (A. marii)

Las cepas que presentaron una mutación morfológica se caracterizan por carecer de la formación de conidios, con lo cual su colonia presentaba una coloración totalmente blanca, denotando la ausencia de conidios y de pigmento en las hifas.

Para confirmar la ausencia de conidios se realizaron observaciones bajo el microscopio óptico y electrónico de barrido, no detectándose en ningún caso la formación de conidios. Los controles de las mismas cepas se caracterizaron por la presencia abundante de estructuras de reproducción asexual y de pigmento.

La cepa A3 mutada no presentó actividad antibiótica alguna sobre los microorganismos frente a los que la cepa salvaje había manifestado actividad, como se demuestra en el apartado correspondiente a resultados.

Por el contrario, la cepa A16 de escasa actividad inhibidora, tras ser sometida durante 20 minutos a la acción de la radiación ultravioleta, presentó un notable incremento de su capacidad antibiótica, obteniéndose valores de inhibición frente a las bacterias, hongos filamentosos y la levadura ensayada que permite considerar a esta cepa mutada como altamente productora de metabolitos activos.

- Efecto de la nitrosoguanidina

En la Tabla número 24 se han resumido los índices de supervivencia detectados al someter a las cepas del género Arthrinium a la acción de la nitrosoguanidina.

Las cepas presentaron un mayor índice de supervivencia al ser tratadas con nitrosoguanidina que tras el tratamiento con radiaciones ultravioleta, estos resultados coinciden con los aportados por García, 1992, al exponer cepas de Aspergillus a este agente mutágeno.

Los índices de supervivencia medios para las especies del género corresponden a:

<u>A. aureum</u>	2.99%
<u>A. arundinis</u>	3.00%
<u>A. francii</u>	4.92%
<u>A. georgii</u>	6.22%
<u>A. hispanicus</u>	3.10%
<u>A. javii</u>	8.17%
<u>A. marii</u>	3.35%
<u>A. mediterranii</u>	5.53%
<u>A. phaeospermum</u>	6.02%
<u>A. philippi</u>	4.34%
<u>A. puccinoides</u>	5.56%
<u>A. saccharicola</u>	4.34%
<u>A. serenensis</u>	8.01%
<u>A. urticae</u>	4.91%

Al realizar una determinación y análisis de las posibles mutantes morfológicas y de actividad detectadas tras la exposición a este agente, debemos constatar que tan sólo se detectaron mutantes morfológicas, en total quince, pertenecientes a las especies siguientes:

<u>A. aureum:</u>	2 cepas
<u>A. arundinis:</u>	2 cepas
<u>A. hispanicus:</u>	1 cepa
<u>A. marii:</u>	3 cepas
<u>A. mediterranii:</u>	2 cepas
<u>A. phaeospermum:</u>	2 cepas
<u>A. saccharicola:</u>	3 cepas

A partir de ninguna de las cepas pudo obtenerse una mutante de actividad.

Las cepas A3 y A16 de las que se pudieron obtener mutantes en el tratamiento con radiaciones ultravioleta, también permitieron obtener mutantes morfológicas a partir de someterlas a la acción de la nitroso-guanidina.

5.1.10. Discusión de los resultados correspondientes a la detección de partículas semejantes a virus y su relación con los cambios morfológicos y de actividad de cepas del género Arthrinium.

En las Fotografías aportadas puede apreciarse la presencia de partículas de aspecto hexagonal que semejan la morfología típica de micovirus y que se detectaron de forma sistemática en cultivos no sometidos a tratamientos con agentes mutágenos y que carecían de forma espontánea de la formación de conidios, por lo que fueron denominados variaciones morfológicas.

Las hifas analizadas bajo el microscopio electrónico de transmisión fueron también observadas bajo el microscopio electrónico de barrido y comparada su morfología con las procedentes del mismo cultivo en las que se detectaba la formación de abundantes conidios, como se aporta en las Fotografías correspondientes.

Estabilizados los cultivos con hifas estériles, se procedió a realizar los estudios de actividad de sus extractos crudos, comparando con los resultados obtenidos a partir de cultivos esporulados.

La cepa elegida para la realización de este estudio fue la cepa A22 perteneciente a la especie A. mediterranii ya que en ella se lograron detectar mayor número de partículas semejantes a virus y estabilizar los cultivos estériles con mayor facilidad y repetitividad.

Los resultados obtenidos se aportan en las Gráfica número 8, en la que se expresan los porcentajes de lisis para los microorganismos ensayados.

Analizando los resultados obtenidos podemos establecer una posible correlación entre la presencia de partículas semejantes a virus, la ausencia de esporulación y la actividad antimicrobiana, dado que en términos generales la cepa con variaciones morfológicas, poseen una mayor actividad inhibidora que la cepa salvaje.

5.1.11. Discusión de los resultados correspondientes a los espectros y a la caracterización química de los metabolitos.

La observación e interpretación de los espectros obtenidos tras el análisis y purificación de los metabolitos mayoritariamente obtenidos de las cepas del género Arthrinium que presentaban actividad inhibidora frente a diversos microorganismos, permiten afirmar que si bien los metabolitos obtenidos están directamente relacionados con la familia de las Papulacandinas, en algunos casos presentan radicales que los diferencian de los metabolitos descritos hasta el presente y cuya actividad había sido descritos por Traxler y cols. en 1977. Recientemente Dubois y Beau, 1992, han descrito un nuevo derivado de la familia de las Papulacandinas, que tampoco presenta la actividad que se detecta a partir de las cepas por nosotros aisladas e identificadas.

A partir de los datos de actividad aportados consideramos que estamos en presencia de un nuevo derivado que posee un radical metilo, probablemente en la posición indicada en el esquema de la página 158.

La posible síntesis de este nuevo derivado permitiría confirmar la estructura del mismo y obtener un metabolito cuyo amplio espectro de actividad ha sido demostrado en el apartado correspondiente. Sería también de gran interés poder establecer a través de una espectrofotometría de masas la caracterización completa de cada uno de los componentes elaborados y acumulados por las cepas en estudio.

Junto a este probable nuevo metabolito las cepas ensayadas elaboran y acumulan diversos tipos de Papulacandinas que permiten interpretar su actividad sobre las levaduras, coincidiendo en ello con los datos aportados por Traxler y cols., 1977.

Asimismo y como ya hemos señalado nuestros resultados corroboran los aportados por Larrondo, 1989 y por Agut, 1992, en estudios realizados a partir de las mismas cepas del género Arthrinium ensayadas a lo largo de este estudio, pero que en el caso de estos autores fueron investigadas por otras metodologías.

5.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS REALIZADOS EN FERMENTADOR.

Los resultados obtenidos tras los estudios realizados en fermentador, se resumen en las Gráficas números 12 a 17. En ellas se pueden observar las variaciones de desarrollo detectadas cuando la concentración de glucosa adicionado al medio de cultivo base era de 5, 10, 20 o 30 g/l.

Los estudios se realizaron sometiendo los cultivos a la acción de la luz o de la oscuridad.

El estudio comparativo de los resultados obtenidos permite aportar que la luz o la oscuridad no influye significativamente en el desarrollo de las cepas.

El coeficiente específico de crecimiento para los ensayos con 20 g/l de glucosa en presencia o en ausencia de luz son respectivamente de 0.02377 y 0.02136 mientras que cuando el ensayo se realiza con 10 g/l de glucosa es de 0.3929. Este hecho pone en evidencia que al disminuir la concentración de glucosa a la mitad, se produce un incremento proporcionalmente equivalente del coeficiente específico de crecimiento.

La actividad inhibidora de las cepas se ve influenciada por la presencia o ausencia de luz, observándose que la producción y variedad de metabolitos secundarios es dependiente de este factor.

Asimismo, a bajas concentraciones de glucosa y en ausencia de luz se observa una mayor actividad antibiótica de las cepas en estudio. En las mismas concentraciones de carbohidrato, pero en presencia de luz, se detecta una reducción del metabolismo, deteniéndose la actividad primaria de las cepas entre el cuarto o quinto día de incubación.

Concentraciones de 20 g/l determinan la producción y acumulación de metabolitos secundarios activos frente a bacterias Gram positivas y frente a levaduras, mientras que a concentraciones de 10 g/l de glucosa los metabolitos activos elaborados son sólo activos frente a levaduras, observándose que constituyen un factor de desarrollo al ser adicionados los extractos a los cultivos de bacterias Gram positivas.

La capacidad de consumo de glucosa en las diferentes condiciones del ensayo ha sido resumida en la Gráficas números 18 y 19.

Asimismo el requerimiento de mantenimiento de glucosa en el medio se aporta en la Gráfica número 20.

Finalmente podemos destacar que a partir de los datos recopilados en la Tabla número 27, puede deducirse que el porcentaje de glucosa consumida llega a ser del 100% cuando han transcurrido catorce días desde el inicio del cultivo y se realiza el ensayo en ausencia de luz. La concentración inicial de glucosa fue de 20g/l, valor que corresponde a la concentración de glucosa adicionada al medio de cultivo agar extracto de malta al 2% que como hemos señalado es el utilizado como medio de cultivo base o en su caso de referencia a lo largo de todo el estudio.

5.3. DISCUSION DE LA POSIBLE UTILIZACION DE LOS METABOLITOS DEL GENERO Arthrinium.

Las normas dictadas por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en lo referente a los aditivos admitidos en la alimentación de los animales, se resumen en la Orden de 23 de marzo de 1988 (B.O.E. 16 abril 1988), reduciéndose a siete el número de antibióticos permitidos, en base a:

- 1.- Un mejor control de las resistencias que se manifiestan en los microorganismos.
- 2.- Que el aditivo tenga un efecto favorable sobre la producción animal.
- 3.- Que estos productos sean controlables en los alimentos.

La potencia antibiótica demostrada "in vitro" por los metabolitos del género Arthrinium así como el hecho de que no sea de uso en terapéutica puede determinar que estos metabolitos sean útiles como potenciadores o promotores del crecimiento de los animales, pudiendo en este sentido, tras corroborar su falta de toxicidad sobre los animales y sobre el hombre, ser utilizados como aditivos, de los que como se ha señalado, la lista aceptada es cada vez más restringida.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Evalrados los resultados obtenidos y a modo de resumen, podemos aportar las conclusiones siguientes:

- 1.- Las cepas del género Arthriniun ensayadas poseen una amplio espectro de actividad antimicrobiana, dado que ha sido posible detectar su acción inhibidora sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, sobre hongos filamentosos y sobre levaduras.
- 2.- Los extractos crudos obtenidos de cepas del género Arthriniun poseen actividad no sólo sobre la viabilidad de las cepas bacterianas sino que también determinan modificaciones en la morfología de las bacterias capaces de mantenerse viables, en contacto con el extracto.
- 3.- Las larvas de Artemia salina fueron sensibles a la acción de los extractos de las cepas de Arthriniun, detectándose la actividad de los mismos desde las 4h 30' de su puesta en contacto con las larvas.
- 4.- La actividad de las cepas del género Arthriniun se debe fundamentalmente a los metabolitos que se aíslan en la fase orgánica, separada a partir del extracto crudo total.

- 5.- En términos generales, se observa que entre el séptimo y el octavo día de desarrollo de las cepas del género Arthrinium se detecta un punto óptimo de producción de metabolitos secundarios con actividad antibiótica, que vuelve a manifestarse al decimocuarto día de incubación de las cepas.
- 6.- La curva de crecimiento de las cepas del género Arthrinium pone de manifiesto que existe una primera fase de desarrollo que coincide con el máximo descenso del valor de pH del medio de cultivo, entre el primer y el sexto día. A partir del decimotercer día, vuelve a detectarse un importante incremento en el desarrollo de las cepas.
- 7.- El sistema solvente de elección para la visualización y desarrollo de las cromatografías en capa fina de los metabolitos del género Arthrinium es el compuesto por benceno/metanol/ácido acético glacial (24:2:1).
- 8.- Las cepas con mayor actividad antibiótica frente a Staphylococcus aureus detectada por bioautografía fueron: A. georgii, A. marii, A. saccharicola y A. serenensis.
- 9.- Las especies con mayor capacidad para presentar mutaciones morfológicas, tras su exposición a radiaciones ultravioleta y a la nitrosoguanidina fueron: A. aureum y A. marii.
- 10.- En dos cepas fue posible obtener una doble mutante, morfológica y de actividad al ser sometidas a la radiación ultravioleta durante 20'. Esta cepas fueron: A3 (A. aureum) y A16 (A. marii):

- 11.- La exposición a la nitrosoguanidina, sólo permitió diferenciar mutantes morfológicas.
- 12.- Se detectó la presencia de partículas semejantes a virus en hifas morfológicamente alteradas de cepas del género Arthrinium, estableciéndose una correlación entre la presencia de variaciones morfológicas, la detección de partículas semejantes a virus y un incremento de la actividad antibiótica, en cepas del género Arthrinium.
- 13.- Entre los metabolitos detectados en las cepas del género Arthrinium podemos destacar la presencia de Papulacandinas, siendo significativa la detección de un nuevo derivado de esta misma Familia de antibióticos, caracterizado por la presencia de un radical metilo.
- 14.- Al analizar las condiciones de cultivos en fermentador, podemos destacar que al disminuir la concentración inicial de glucosa a la mitad, se produce un incremento proporcionalmente equivalente del coeficiente específico de crecimiento de la cepa.
- 15.- La actividad inhibidora de las cepas se ve marcadamente influenciada por el hecho de realizar los cultivos en presencia o en ausencia de luz, observándose que la producción y variabilidad de metabolitos secundarios elaborados y acumulados por las cepas, es dependiente de este factor.
- 16.- A bajas concentraciones de glucosa y en ausencia de luz se observa una mayor actividad antibiótica de las cepas en estudio.
- 17.- A bajas concentraciones de carbohidrato, pero en presencia de luz, se detecta una reducción del metabolismo de las cepas, deteniéndose la actividad primaria de las cepas entre el cuarto y el quinto día de incubación.

- 18.- La presencia o ausencia de luz influye en la producción de pigmentos por parte de las cepas del género Arthrinium, denotando un carácter cromógeno.
- 19.- El amplio espectro de actividad de los metabolitos detectados y la potencia demostrada "in vitro" por los mismos permite plantear su posible aplicación como aditivos para promocionar o potenciar el crecimiento de los animales de consumo.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

AGUT, M.- 1992. Estudio de la influencia de factores mediales y enzimáticos sobre la capacidad antibiótica del género Arthrinium. Tesis doctoral. U.A.B.

AHARONOWITZ, Y.- 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. Ann. Rev. Microbiol. 34: 209-233.

AINSWORTH, G.C.- 1976. Introduction to the History of Mycology. Cambridge University Press, Great Britain.

ANDERSON, T.F.- 1953. Techniques for the preservation of three-dimensional structures in preparing specimens for the electron microscope. Trans. N.y.Acad. SCI 13. 130-134.

ANDERSON, B., P. BELL, V. BRUNK y V.P. COLLINS.- 1976. The osmotic effects of glutaraldehyde during fixation: a transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytochemical study, J. Ultrastruct. res. 56: 339-350.

ARVIDSON, S., K. DORNBUSCH y H. ERICSSON.- 1981. Interpretation of the agar diffusion method for bacterial susceptibility testing. J. Antimicrobial Chemotherapy 7: 5-14.

ARX, J.A. VON.- 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer, Lehre, Alemania.

AVALOS, J., J. CASADESUS y E. CERDA-OLMEDO.- 1985. Gibberella fujiikuroi mutants obtained with u.v. radiation and N-methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. Appl. Environ. Microbiol. 49: 187-191.

BARTLETT, A.A. y H.P.BURSTYN.- 1975. A review of the physics of critical point drying. Proc. 8th. Ann. IITRI-SEM Sym. 1: 305-316.

BECKETT, A., R. PORTER y N. D. READ.- 1982. Low temperature scanning electron microscopy of fungal material. J. Microsc. (Oxford) 125: 193-199.

BENNETT, J. W. y L. A. GOLDBLATT. 1973. The isolation of mutants of aspergillus flavus and A. parasiticus with altered aflatoxin producing ability. Sabouraudia 11: 235-241.

BERTOLDI, M. de.- 1976. New species of Humicola: an approach to genetic and biochemical classification. Can. J. Bot. 54 (2): 1755-1768.

BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO.- Orden de 23 de marzo de 1988 por la que se dictan normas relativas a los aditivos en la alimentación de los animales (B.O.E. núm. 92, 16 abril 1988).

BONNEL, B.S. Y LEVETIN, E.- 1981. The influence of nutrition on the growth and sporulation of two strains of Epicoccum nigrum. Mycologia 73: 238-243.

BOOTH, C.- 1971. Methods in Microbiology Vol.4.- Academic Press.

BOYDE, A.- 1980. Review of basic preparation techniques for biological scanning electron microscopy. Electron Microscop. 2.: 768-777.

BRACKER, C.E.- 1967a.- Ultrastructure of fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 5: 343-374.

BRACKER, C.E.- 1967b.- Ultrastructure of fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 30: 159-193.

BRIDGE COOKE, W.H.- 1954. The genus Arthrrium. Mycologia 46: 815-821.

BU'LOCK, J.D.- 1961. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Adv. Appl. Microbiol. 3: 293-342.

BU'LOCK, J.D.- 1967. Essays in biosynthesis and microbiological development. John Wiley & Sons Inc. New York.

BU'LOCK, J.D.- 1976. Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development, pp. 33-58. En Smith, J.E. y Berry, D.R. (ed.). The filamentous fungi. vol. 1 John Wiley & Sons Inc., New York.

BURNETT, J.H.- 1976. Fundamentals of Mycology. 2nd. Edition. Edward Arnold, Great Britain.

CALVO, M.A. y J. GUARRO.- 1980. Arthrinium aureum sp. nov. from Spain. Trans. Brit. Mycol. Soc. 75(1): 156-157.

CALVO, M.A., M.A. VIA, A. BUSQUE y R.M. CALVO.- 1982. Pouvoir antibiotique d'Arthrinium aureum et Arthrinium phaeospermum. Crypto. Mycol. 3: 145-150.

CAMPBELL, A.H.- 1960. Antimicrobial activity from microorganisms. British Medical Bull. 16: 82-85.

CAMPBELL, R.- 1975. The ultrastructure of the Arthrinium state of Apiospora montagnei Sacc. Protoplasma 83: 51-60.

CANDELI, A., A. DE BARTOLOMEO, V., MASTRANDREA y F. TROTTA.- 1978. Contribution to the characterization of Bacillus megaterium. Int. J. of Systematic Bacteriology 29: 26-31.

CARMICHAEL, J.W., W. B. KENDRICK, I.L. CONNERS y L. SIGLER.- 1980. Genera of Hyphomycetes. University of Alberta Press. Edmonton.

CARTER, H. P. y J. L. LOCKWOOD.- 1956. Methods for estimating numbers of soil microorganisms lytic to fungi. Phytopathology 47: 151-154.

COLE, G.T. y R.A., SAMSON.- 1979. Patterns of development in conidial fungi. Pitman Press, London.

COOKE, W.B.- 1949. The genus Arthrinium. Mycologia 46: 815-822.

CUNDLIFFE, E.- 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide?. Ann. Rev. Microbiol. 43: 207-233.

DABINETT, P.E. y WELLMAN, A.M.- 1978. Numerical taxonomy of certain genera of Fungi Imperfecti and Ascomycotina. Can. J. Bot. 56 (17): 2031-2049.

DAY, J.B. y MANTLE, P.G.- 1985. Large Scale and pH controlled fermentation production of the tremorgenic mycotoxin verruculogen. Biotechnology and Bioengineering 27: 1586-1590.

DEMAIN, A.L.- 1974. How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide?. Ann. New York Acad. Sci. 235: 601-612.

DEMAIN, A. L. Y J. M. PIRET.- 1981. Why secondary metabolism?. Microbiology 1981. pp: 363-366. Ed. D. Schelessinger. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

DEPLOEY, J.J.- 1976. Pectin utilization by thermophilic fungi. Pen. Acad. Sci. 50: 179-181.

DHAR, M.M. y A.W. KHAN.- 1971. Secondary Metabolism. Nature (London) 233: 182-184.

DREW, S.W. y A.L. DEMAIN.- 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism, Ann. Rev. Microbiol. 31: 343-356.

DOMSCH, K.M., GAMS, W. y ANDERSON, T.H.- 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press Inc., London.

DUBOIS, E. y J., BEAU.- 1992. Papulacandins and chaetiacandin: a stereoselective route to their basic skeleton by a palladium-mediated arylation of 4,6,-O-benzylidene-3-o-tert-butyl dimethylsilyl-1-tributyl-stannyl-D-glucal. Carbohydrate Research 223: 157-167.

EICHLIN, P. - 1975. Sputter coating techniques for SEM. Proc. 8th. Ann. II-SEM Symp. Chicago.

EICHLIN, P. y G. KAYE. - 1979. Thin films for high resolution conventional electron microscopy. Scanning Electron Microsc. 2: 21-30.

EIJK, G.W. van. - 1975. Bostrycin, a tetrahydroanthraquinone pigment and some other metabolites from the fungus Arthrrium phaeospermum. Experientia 31: 783-784.

ELLIS, M.B. - 1965. Dematiaceous Hyphomycetes. VI. Mycological Paper n^o 3. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.

ELLIS, M.B. - 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. C.A.B. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

ELLIS, M.B. - 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. C.A.B. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

ELLIS, D.H. - 1980. Preparation of fungi for transmission electron microscopy. Micron. 11. 495-496.

FERNANDEZ-MORAN, H. - 1956. Applications of diamond knife for ultrathin sectioning to be study of fine structure of biological tissues and metals. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, supp. 29.

FILTENBORG O. y J. C. FRISVARD. - 1980. A Simple Screening-method for toxicogenic molds in pure cultures. Lebensm. Wiss. u. Technol. 13: 128-130.

FROYSHOR, O., T.L. ZIMMER, S.G. LALAND. - 1978. Biosynthesis of microbial peptides by the thiotemplate mechanism. M.T.P. Int. Rev. Sci. 18: 32.

GARCIA ACHA, I.- 1956. Desarrollo y metabolismo del hongo Cephalotecium roseum sobre medios sintéticos. Tesis doctoral. Madrid.

GARCIA SANCHEZ, M.-E.- 1992. Estudio de la ruta biosintética de las aflatoxinas en A. parasiticus (Descripción de un posible nuevo intermediario). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

GERHARDT, P., P. MUTTAY, R.N. COSTILOW, E.W. NESTER, W.A. WOOD, N.R.KRIEG, G.B. PHILLIPS. Ed. 1981. Manual of methods for general Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

GJAERUM, H.B.- 1966. The genus Arthrinium in Norway. Nytt Magasin for Botanikk 13: 5-14.

GJAERUM, H.B.- 1967. Arthrinium morthieri, A. fuckleii n.sp. and A. ushuvaiese. Nytt Magasin for Botanikk 14: 1-6.

GLAUERT, A.M. y R. H., GLAUERT.- 1958. Araldite as a embedding medium for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 191.

GLAUERT, A.M., G.E. ROGERS y R. H., GLAUERT.- 1956. A new embedding medium for electron microscopy. Nature (London) 178: 803.

GRUNDERG, E.y E. TITSWOERTH. 1975. Laboratory evaluation of antifungal agents. Development in industrial Microbiology 16: 201-204.

GUARRO, J.- 1978. Estudio taxonómico de la micoflora aislada de excipientes farmacéuticos. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.

HAAVIK, H.I.- 1979. On the physiological meaning of secondary metabolism. Folia Microbiol. 24: 365-367.

HAMILTON MILLER, J.M.T.- 1974. Fungal sterols and the mode of action of the polyeneantibiotics. Adv. Appl. Microbiol. 17: 109-134.

HANKIN, L. y ANAGNOSTAKIS, S.L.- 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67(3): 597-607.

HARWING, J. y P. M. SCOTT.- 1971. Brine shrimp (Artemia salina L.) larvae as a screening system for fungal toxins. Appl. Microbiol. 21: 1011-1016.

HAWKSWORTH, D.L.- 1974. Mycologist's Handbook. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Great Britain.

HAWSWORTH, D.L., SUTTON, B.C. y AINSWORTH, G.C.- 1983. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 7 ed., Commonwealth Mycological Institute, Kew, Great Britain.

HIRSCH, C.F.- 1981. Regulation of secondary Metabolism in microorganisms. Microbiology-1981, pp: 306-352. Ed. D. Schlessinger. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

HOHNEL, F. von.- 1925. Über die Gattung Arthrimum Kunze. Mitt. a.d. Bot. Inst. Tech. Hochsch. Wien 1: 9-16.

HUDSON, H.J.- 1960. Pyrenomycetes of sugar cane and other grasses in Jamaica. I. Conidia of Apiospora camptospora and Leptosphaeria sacchari. Trans. Brit. Mycol. Soc. 43: 607-616.

HUDSON, H.J.- 1963 a. Pyrenomycetes of sugar cane and other grasses in Jamaica. II. Conidia of Apiospora montagnei. Trans. Brit. Mycol. Soc. 46 (1): 19-23.

HUDSON, H.J.- 1963 b. The perfect state of Nigrospora oryzae. Trans. Brit. Mycol. Soc. 46(3): 355-360.

HUDSON, H. J., E.H.C. Mc KENZIE e I. C. TOMMERUP.- 1976. Conidial states of Apiospora Sacc. Trans. Brit. Mycol. Soc. 66 (2): 359-362.

HUGHES, S.J.- 1953. Conidiophores, conidia and classification. Can. J. Bot. 31: 577-659.

HUMBLE, M.W., KING, A. y I, PHILLIPS.- 1977. Api Zym: a simple rapid system for the detection of bacteria enzymes. J. Clin. Pathol. 30: 275-277.

ISHIYAMA, T., T.FURUTA, M.TAKAI, Y. OKIMOTO, S. AIZAWA, A. SHIMAZU y H. YONEHARA.- 1975. L-threo-beta-hydroxyaspartic acid as an antibiotic aminoacid. J. of antibiotic 28: 821-823.

ITO, J., S. J. SPEZIZEN.- 1972. Early-blocked asporogenous mutants of Bacillus subtilis. En Spores. Eds. H.O. Halvorson y L.L. Campbell. vol. V: 107-112. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

JERNELOV, A. y A.L. MARTIN.- 1980. Ecological implications of metal metabolism by microorganisms. Ann. Rev. Microbio. 29: 61-77.

KARNOVSKY, M. J.- 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell. Biol. 23: 137.

KENDRICK, B. (Ed.).- 1971. Taxonomy of Fungi Imperfecti. University of Toronto Press, Toronto.

KENDRICK, B. (Ed.).- 1979. The whole fungus. Vol. I y II. National Museum of Natural Sciences. National Museum of Canadá and Kananaskis.

KENDRICK, B.. 1980. The generic concept in Hyphomycetes. A reappraisal. Mycotaxon 11(1): 339-364.

KENDRICK, B. y J.W. CARMICHAEL.- 1973. Hyphomycetes. En The Fungi. An advanced treatise. vol. IV A. pp. 2434-2509. Ainsworth, Sparrow y Sussman Eds. Academic Press

KOLLMORGENM J. F. y L. C. JONES.- 1979. The effects of soil-borne microorganisms on the germination of chlamydospores of Tilletia caries and T. foetida. Soil. Biol. Biochem 7: 407-411.

KOMORI, T. y Y. ITOH.- 1985. Chaetocandin. A novel papulacandin. II. Structure determination. Journal of Antibiotics 38: 54-546.

KOSKELA, P.-1983. Arthrinium globosum, a new hyphomycetous species. Karstenia 23: 13-14.

LARRONDO, J.- 1989. Taxonomía y ultraestructura del género Arthrinium. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.

LARRONDO, J. y MA A. CALVO.- 1989. Influence of vitamins on the inhibiting activity of some strains of the Arthrinium genus. Microbios letters 40: 17-18.

LARRONDO, J. y MA A. CALVO.- 1990. Influence of the addition of mineral salts on the inhibitory activity of strains of the Arthrinium genus. Microbios 63: 17-20.

LARRONDO, J. y MA A. CALVO.- 1990. Extracellular enzymatic activities in Arthrinium species. Microbios 63: 159-163.

LARRONDO, J. y MA A. CALVO.- 1990. Two new species of Arthrinium from Spain. Mycologia 82: 396-398.

LARRONDO, J. y MA A. CALVO.- 1991.- Effect of essential oils on Candida albicans: a scanning electron microscope study. Biomedical letters 46: 269-272.

LARRONDO, J. y MA A. CALVO.- 1992. New contributions to the study of the genus Arthrinium. Mycologia 84: 475-478.

LARRONDO, J., M., AGUT, R. MA CALVO Y MA A. CALVO.- 1992. Estudio del género Arthrinium en el noreste español (Deuteromycetes, Dematiaceae). Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Sec. Biol.) 89: 43-49.

LEAICH, L.L. y K. E. PAPA.- 1974. Aflatoxins in mutants of Aspergillus flavus. Mycopathol. Mycol. Appl. 52: 223-229.

LEE, L.S., J.W. BENNETT, A.F., CUCULLU y J.B. STANLEY.- 1975. Synthesis of versicolorin A by a mutant strain of Aspergillus parasiticus deficient in aflatoxin production. J. Agric. Food. Chem. 23: 1132-1134.

LEE, L. S., J. W. BENNETT, L. A. GOLDBLATT y R. E. LUNDIN.- 1971. Norsolorinic acid from a mutant strain of Aspergillus parasiticus. J. Amer. Oil Chem. Soc. 48: 93-94.

LEMKE, P. A.- 1979. Viruses and plasmids in fungi. Marcel Dekker Publishers. New York.

LEMKE, P.A.- 1981. Extranuclear inheritance in eucaryotic microbes. Highlights in Microbiology 1979-80: 1-4. A.S.M.

LENNOX, J.E. y C. K. DAVIS.- 1983. Selection of and complementation analysis among aflatoxin deficient mutant of Aspergillus parasiticus. Expert. Mycol. 7: 192-195.

LINDAU, G.- 1922. Kryptogamenflora für Anfänger. Die Mikroskopischen Pilze. 2ª Ed. Berlin.

LUCKNER, H., L. NOVER y H. BOHM.- 1977. Secondary metabolism and cell differentiation. Mol. Biol. Biochem. Biophys. 23: 3.

LUFT, J.H.- 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409-414.

MARTIN, J.F. y L. DEMAINE.- 1980. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 31: 343.

MARTIN, J.F. y P. LIRAS.- 1989. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. Ann. Rev. Microbiol. 43: 173-206.

MASON, E.W.- 1933. Annotated account of fungi received at the Imperial Mycological Institute. List II (fascicle 2). Mycological Papers 3: 1-67.

MASON, E.W.- 1937. Annotated account of fungi received at the Imperial Mycological Institute. List II (fascicle 3). Mycological Papers 4: 1-99.

MASON, E.W.- 1941. Annotated account of fungi received at the Imperial Mycological Institute. List II (fascicle 3, special part). Mycological Papers 5: 101-144.

McKALLAN, S. E. y WILLCOXON.- 1940. An analysis of factors causing variations in spore germination test of fungicides I. Methods of obtaining spores. Contr. Boyce Thompson Inst. 2: 5-20.

MINTER, D.M.- 1985. A re-appraisal of the relationships between Arthrinium and other Hyphomycetes. Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.) 94 (2-3): 281-308.

MULLER, E. y J.A. von ARX.- 1962. Die gattungen der didynosporen Pyrenomyceten. Beitrage zur Kryptogamenflora der Schweiz 11 (2): 1-922.

PIRT, S.J. y RIGHELATO, R.C.-1967. Effect of growth rate on the synthesis of penicillin by Penicillium chrysogenum in batch and chemostat cultures. Appl. and Env. Microbiol. 15: 1284-1290.

POLLACK, F.G. y C.R.BENJAMIN.- 1969. Arthrinium japonicum and notes on Arthrinium kantschaticum. Mycologia 61(1): 187-190.

RAPER, K.B. y C. THOM.-1968. A manual os the Penicillia. Williams & Wilkins Co. Baltimore, 875 pp.

ROBARDS, A. W., A. J. WILSON y P. CROSBY.- 1981. Specimen heating during spulter-coating. J. Microsc. (Oxford) 124: 143-153.

ROBINSON, P.M.- 1978. Practical fungal physiology. Ed. Wiley, J. and Sons, 123 pp.

ROMMELE, G., P. TRAXLER y W. WEHRLI.- 1983. Papulacandins- The relationship between chemical structure and effect on glucan synthesis in yeast. Journal of Antibiotics 36: 1539-1542.

SAMUELS, G.J., E.H.C. MCKENZIE y D.E. BUCHANAN.- 1981. Ascomycetes of New Zealand. Two new species of Apiospora and their Arthrinium anamorph on bamboo. New Zealand J. of Bot. 19: 137-149.

SMITH, J.E. y D.R. BERRY (Ed.).- 1978. The filamentous fungi. John Wiley & Sons, Inc. New York.

SPURR, A. R.- 1969. A low-viscosity epoxy resines embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26: 31-43.

SUBRAMANIAN, C.V.- 1962. A classification of the Hyphomycetes. Current Science 10: 409-411.

SUBRAMANIAN, C.V.- 1963. Classification of the Hyphomycetes. Bull. Bot. Surv. india 4: 249-259.

SUBRAMANIAN, C.V.- 1983. Hyphomycetes. Taxonomy and Biology. Academic Press Inc. London

TALBOT, P. H. B.- 1971. Principles of fungal taxonomy. McMillan Press, England.

TOWNSEND, C.A., S.B. CHRISTENSEN y S.G. DAVIS. 1988. Synthesis of averufin and its role in aflatoxin B₁ biosynthesis. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 839-861.

TOWNSEND, C.A., K.A. PLAVCAN, K. PAL y S.W. BROBST.- 1988. Hydroxyversicolorone: isolation and characterization of a potential intermediate in aflatoxin biosynthesis. J. Org. Chem. 53: 2472-2477.

TRAXLER, P., J. GRUNER y J.A.L. AUDEN.- 1977. Papulacandins, a new family of antibiotics with antifungal activity. I. Fermentation, isolation, chemical and biological characterization of Papulacandins A,B,C,D and E. J. of Antibiotics 30(4): 289-296.

TRAXLER, P., H. FRITZ, H. FUHRER y W.J. RICHTER.- 1980. Papulacandins, a new family of antibiotics with antifungal activity. Structures of papulacandins A,B,C and D. J. of Antibiotics 33(9): 967-978.

TRAXLER, P., W. TOSCHM y O. ZAK.- 1987. Papulacandins. Synthesis and biological activity of papulacandin B derivatives. J. of Antibiotics 40: 1145-1164.

TUBAKI, K.- 1963. Taxonomic study of Hyphomycetes. Ann. Inst. Ferm. Osaka I (1961-.1962): 25-54.

VOROS, J.- 1969. Review of the mycoflora of Hungary. Part VI. Acta Phytopathologica Sci. Hungaricae 4(2-3): 239-260.

VOROS, J. y J. LERANTH.- 1974 a. Review of the mycoflora of Hungary. Part XI. Deuteromycetes. Moniliales. Acta Phytopathologica Sci. Hungaricae 9(1-12): 99-123.

VOROS, J. y J. LERANTH.- 1974 b. Review of the mycoflora of Hungary. Part XII. Deuteromycetes. Moniliales and Myceliales. Acta Phytopathologica Sci. Hungaricae 9(3-4): 333-361.

WAKSMAN, S.A. y H.A. LECHEVALIER.- 1962. The Actinomycetes, vol. III, Antibiotics of Actinomycetes. Williams & Wilkins, Baltimore.

WEBSTER, J.- 1966. Spore projection in Epicoccum and Arthrinium. Trans. Brit. Mycol. Soc. 49 (2): 339-343.

WEINSBERG, E.D.- 1981. The concept of secondary metabolism. Microbiology - 1981, 157-359. Ed. D. Schlestringer. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

WEINSBERG, E.D.- 1978. Secondary metabolism: Regulation by phosphate and trace elemens. Folia Microbiol. 23: 496-504.

WEY-BANG, Z. y A.CONSTANTINIDES.- 1988. Modeling, optimization and computer control of the cephalosporin C fermentation process. Biotech. and Bioengineering 32: 277-288.